

**Synthese von Oligosacchariden der Zellmembran
mit neuartigem Verzweigungsmuster
und von lipidhaltigen Signalstoffen
pflanzlicher Symbionten**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Ingo Prahl
aus München

Bayreuth, 2002

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Juni 1998 bis September 1998 am Institut für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München und von Oktober 1998 bis März 2002 am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Carlo Unverzagt durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 17.04.2002

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 03.06.2002

Prüfungsausschuß:

Erstgutachter: Prof. Dr. C. Unverzagt

Zweitgutachter: Prof. Dr. K. Seifert

Vorsitzender: Prof. Dr. F. X. Schmid

Prof. Dr. H. Alt

Prof. Dr. G. Krausch

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	7
2.	Einleitung.....	11
2.1	<i>N</i> -Glycane.....	12
2.1.1	Vorkommen und Biosynthese	12
2.1.2	Core-Modifikationen von <i>N</i> -Glycanen	15
2.1.3	Biologische Rolle der <i>N</i> -Glycane	17
2.2	NOD-Faktoren	20
2.2.1	Die Rhizobien-Leguminosen-Symbiose.....	20
2.2.2	Biosynthese.....	22
2.2.3	NOD-Faktoren: gemeinsames Strukturmotiv und Modifikationen	23
2.2.4	NOD-Faktoren: Wirkungsweise und Bedeutung.....	25
2.3	Themenstellung	29
3.	Chemo-enzymatische Synthese des Lec14- <i>N</i> -Glycans	30
3.1	Chemische Synthese des Lec14- <i>N</i> -Glycans	30
3.1.1	Synthese eines für 1,6-Fucosylierung funktionalisierten Core-Trisaccharids.....	31
3.1.1.1	Synthese eines Chitobiosylazids.....	33
3.1.1.2	Untersuchungen zur direkten β -Mannosylierung.....	35
3.1.1.3	Verwendung der intramolekularen Inversion	43
3.1.2	Synthese des LEC14-Hexasaccharids	45
3.1.3	Synthese des LEC14-Nonasaccharids	48
3.1.4	Entschützung und Kupplung an einen Aminohexanoylspacer	50
3.2	Enzymatische Glycosylierungen	55
4.	Darstellung von LEC14-Neoglycoproteinen	62
5.	NOD-Faktoren und Analoga: Darstellung und Aktivität	64
5.1	Darstellung von monomeren Glucosaminderivaten als NOD-Faktoranaloga.....	64
5.2	Biologische Untersuchungen mit monomeren Glucosaminderivaten	65
5.2.1	Einfluss monomerer Glucosaminderivate auf das Wurzelhaarwachstum	65
5.2.2	Untersuchungen zur Verbesserung der Keimfähigkeit von Weizen und Mais.....	69
5.2.3	Wirkung von Acylmonoglycosiden auf die T-Zell-Proliferation	70
5.3	Syntheseplanung zum Aufbau von Lipochitooligosacchariden	71
5.3.1	Darstellung natürlicher NOD-Faktoren	72
5.3.2	Darstellung von Analoga	80
6.	Zusammenfassung	83

Inhaltsverzeichnis

7.	Summary.....	86
8.	Experimenteller Teil	89
8.1	Versuche zu Kapitel 3.1.1.....	91
8.2	Versuche zu Kapitel 3.1.1.1.....	92
8.3	Versuche zu Kapitel 3.1.1.2.....	95
8.4	Versuche zu Kapitel 3.1.1.3.....	103
8.5	Versuche zu Kapitel 3.1.2.....	105
8.6	Versuche zu Kapitel 3.1.3.....	109
8.7	Versuche zu Kapitel 3.1.4.....	115
8.8	Versuche zu Kapitel 3.2.....	122
8.9	Versuche zu Kapitel 4.....	129
8.10	Versuche zu Kapitel 5.1.....	130
8.11	Material und Methoden zu Kapitel 5.2.1	136
8.12	Material und Methoden zu Kapitel 5.2.2	137
8.13	Versuche zu Kapitel 5.3.1.....	138
8.14	Versuche zu Kapitel 5.3.2.....	157
9.	Danksagung	164
10.	Literaturverzeichnis	166

1. Abkürzungsverzeichnis

[α]	spezifischer Drehwert
Å	Angström
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AH	Aminohexanoyl
Ar	Aromat
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
BSA	Rinderserumalbumin
Bu	<i>n</i> -Butyl
Bzl	Benzyl
CAN	Cer-(IV)-ammoniumnitrat
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
ClAc	Chloracetyl
ClAc ₂ O	Chloressigsäureanhydrid
CMP	Cytidinmonophosphat
COSY	correlated spectroscopy
D	Natrium-Licht der Wellenlänge 589 nm
D	Dublett
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Doppeldublett
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DMAP	4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dol	Dolichol
DTBMP	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-methylpyridin

1. Abkürzungsverzeichnis

EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectroscopy</i>
Et	Ethyl
FAB-MS	<i>fast atom bombardment mass spectroscopy</i>
Fq.	Fluquinconazol
Fuc	L-Fucose
FucT	Fucosyltransferase
Gal	D-Galactose
gef.	gefunden
gem	geminal
ges.	gesättigt
Glc	D-Glucopyranose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
gp	Glycoprotein
h	Stunde(n)
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMQC-COSY	<i>heteronuclear multiple quantum coherence correlated spectroscopy</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Ig	Immunglobuline
<i>J</i>	skalare Kopplung
LCO	Lipochitooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
m	Multiplett
M	molar
Man	D-Mannose
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
Mp	<i>p</i> -Methoxyphenyl
Mpm	<i>p</i> -Methoxybenzyl (<i>p</i> -Methoxyphenylmethylen)
m-RNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

1. Abkürzungsverzeichnis

NAc	Acetamido
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
NeuAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOD	<i>nodulation</i> (Knöllchenbildung)
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
NPht	Phthalimido
OST	Oligosaccharyltransferase
<i>p</i>	para
Ph	Phenyl
Phcm	Phenylcarbamoyl
PP-Dol	Dolicholpyrophosphat
<i>p</i> -Tos-OH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
quant.	quantitativ
RER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
R _f	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Ser	Serin
SEt	Ethylthio
ST	Sialyltransferase
t	Triplett
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCAI	Trichloracetimido
Tf	Trifluormethansulfonyl
Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin

1. Abkürzungsverzeichnis

TMS	Trimethylsilyl
TMS-OTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Ts	Tosyl
UDP	Uridindiphosphat
Xaa	steht für eine beliebige Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl

2. Einleitung

Kohlenhydrate spielen eine entscheidende Rolle in vielen Bereichen des Lebens. So werden sie u.a. zur Energiegewinnung in den Zellen benötigt, dienen in Form von Stärke bzw. Glykogen bei Pflanzen bzw. bei Tieren als Energiespeicher und beispielsweise in Form von ATP als universelle Energieeinheit. Darüber hinaus codieren Kohlenhydrate als Bestandteile von DNA und RNA für Erbinformationen, werden als Botenstoffe eingesetzt und sind an den verschiedensten biologischen Erkennungsprozessen beteiligt. Daher wurde in den letzten Jahren die Forschung über die biologischen Eigenschaften der Kohlenhydrate intensiviert.^[1,2,3,4,5,6,7,8,9]

Für biologische Untersuchungen sind ausreichende Mengen der betreffenden Verbindungen erforderlich, die entweder aus biologischem Material isoliert^[10] oder synthetisiert werden müssen. Dabei birgt die Isolierung meist den Nachteil, dass die gewünschten Substanzen nur im Mikrogramm-Maßstab zugänglich sind. Zusätzlich tritt bei vielen Oligosacchariden das Problem der Mikroheterogenität auf. Es liegen häufig viele, sich voneinander nur geringfügig unterscheidende Verbindungen nebeneinander vor, deren Trennung in präparativen Mengen äußerst schwierig ist.

Die Stärken der Totalsynthese liegen in der Überwindung der oben genannten Schwierigkeiten. Durch Synthese ist der Zugang zu definierten, reinen Verbindungen in (fast) beliebiger Menge möglich. Somit ist die Totalsynthese speziell bei Oligosacchariden mit sich wiederholenden Einheiten, wie z.B. den NOD-Faktoren^[11,12,13,14] vielfach das Mittel der Wahl. Allerdings ist auch die rein chemische Synthese aufwendig, da einige Verknüpfungen, speziell Glycosylierungen mit Neuraminsäurebausteinen, aber auch β -Mannosylierungen, auf chemischen Wege noch nicht zufriedenstellend gelöst wurden. Deshalb sind Publikationen von Kohlenhydratteilstrukturen, vor allem auf dem Gebiet der *N*-Glycane,^[15,16,17,18,19,20,21] wesentlich häufiger anzutreffen als Totalsynthesen.^[22,23]

Ein rein enzymatischer Zugang zu komplexen Oligosacchariden umgeht aufgrund der Substratspezifität, Regio- und Stereoselektivität der Enzyme die bei chemischen Synthesen notwendigen Schutzgruppenmanipulationen und verringert damit drastisch die Anzahl der Syntheseschritte. Der rein enzymatische Ansatz ist nur in wenigen Fällen sinnvoll, da meist nicht alle benötigten Enzyme zur Verfügung stehen. Zur Lösung des Problems wird die Kombination chemischer und enzymatischer Methoden verwendet. Durch die Verknüpfung der jeweiligen Vorteile von chemischer bzw. enzymatischer Synthese konnten einige komplexe *N*-Glycane erstmals vollständig synthetisiert werden.^[24,25,26,27,28,29]

2.1 N-Glycane

2.1.1 Vorkommen und Biosynthese

Dass nahezu alle Proteine des Blutserums und der Zelloberflächen bei höheren Organismen glycosyliert sind, ist seit längerem bekannt und weist auf die vielfältigen Aufgaben der Kohlenhydrate auf Proteinebene und bei Zelloberflächen hin.^[30,31,32,33]

In Glycoproteinen können die Zuckereinheiten auf unterschiedliche Arten mit dem Protein verknüpft sein: *O*-glycosidisch über die Hydroxylfunktion von Serin- oder Threoninresten (*O*-Glycane) oder *N*-glycosidisch über eine Amidbindung in der Asparaginseitenkette (*N*-Glycane). *N*-Glycane zählen häufig mehr als zehn Zuckereinheiten und besitzen ein verzweigtes Pentasaccharid als gemeinsame Corestruktur, das aus zwei *N*-Acetylglucosamin- und drei Mannoseresten besteht. Dabei werden die Strukturen im wesentlichen zwei Verbindungsklassen zugeordnet: Verbindungen vom Oligomannosidtyp besitzen typischerweise Antennen, die nur aus Mannoseeinheiten bestehen. Als komplexe *N*-Glycane werden sialylierte Verbindungen bezeichnet, die ausgehend von der Mannose des Core-Trisaccharids zwei bis fünf Antennen aufweisen. Diese Antennen beginnen mit *N*-Acetylglucosamin und enden meist mit Galactose oder *N*-Acetylneuraminsäure. Verbindungen, die sowohl sialyliert als auch oligomannosyliert sind, werden als Hybridtyp bezeichnet.

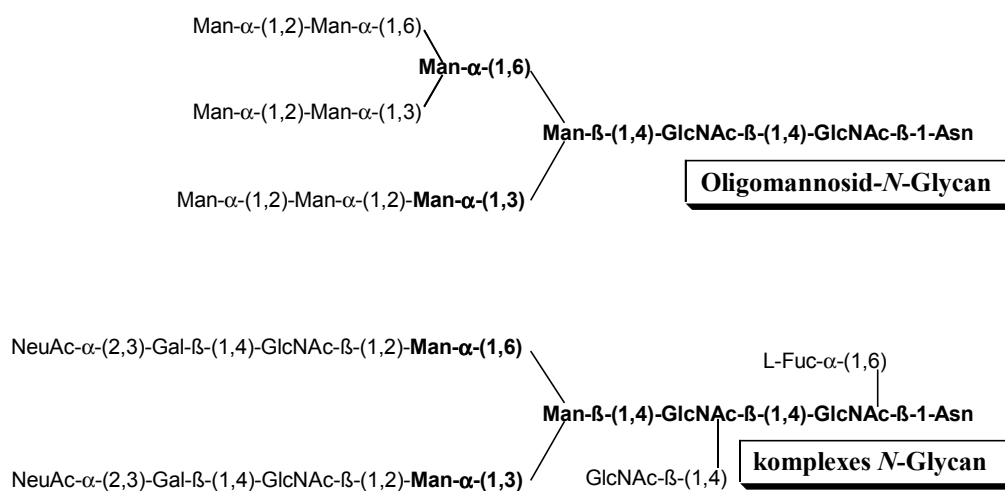


Abb. 2.1: Beispiele für *N*-Glycane vom Oligomannosid- und komplexen Typ; das Core-Pentasaccharid ist jeweils hervorgehoben.

Während die Biosynthese der Kohlenhydratanteile der meist kurzkettigen *O*-Glycane^[34,35] durch den regio- und stereoselektiven Transfer einzelner Zuckereinheiten auf das Protein mittels spezieller Glycosyltransferasen im Golgi-Apparat stattfindet,^[32,35,36,37] beginnt die Biosynthese der *N*-Glycane an einem Lipidanker, dem Dolicholphosphat (**Abb. 2.2**), und

ähnelt damit der Biosynthese der Kohlenhydratstrukturen bei GPI-Ankern^[38]. Dolicholphosphat besteht aus einer variablen Anzahl von Isopreneinheiten mit einer terminalen Phosphatgruppe und ist in der Membran des rauhen endoplasmatischen Reticulums (RER) verankert. Die *N*-Glycansynthese beginnt mit der Anbindung von UDP-gebundenem *N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) an das Dolicholphosphat. Sobald das Core-Pentasaccharid (Man)₅(GlcNAc)₂-Dolicholpyrophosphat gebildet ist, orientiert sich das Pentasaccharid von der cytosolischen Seite der Membran des RER durch einen „Flip“ zum Lumen. Dort wird es weiter aufgebaut bis zum Tetradecamer (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂.

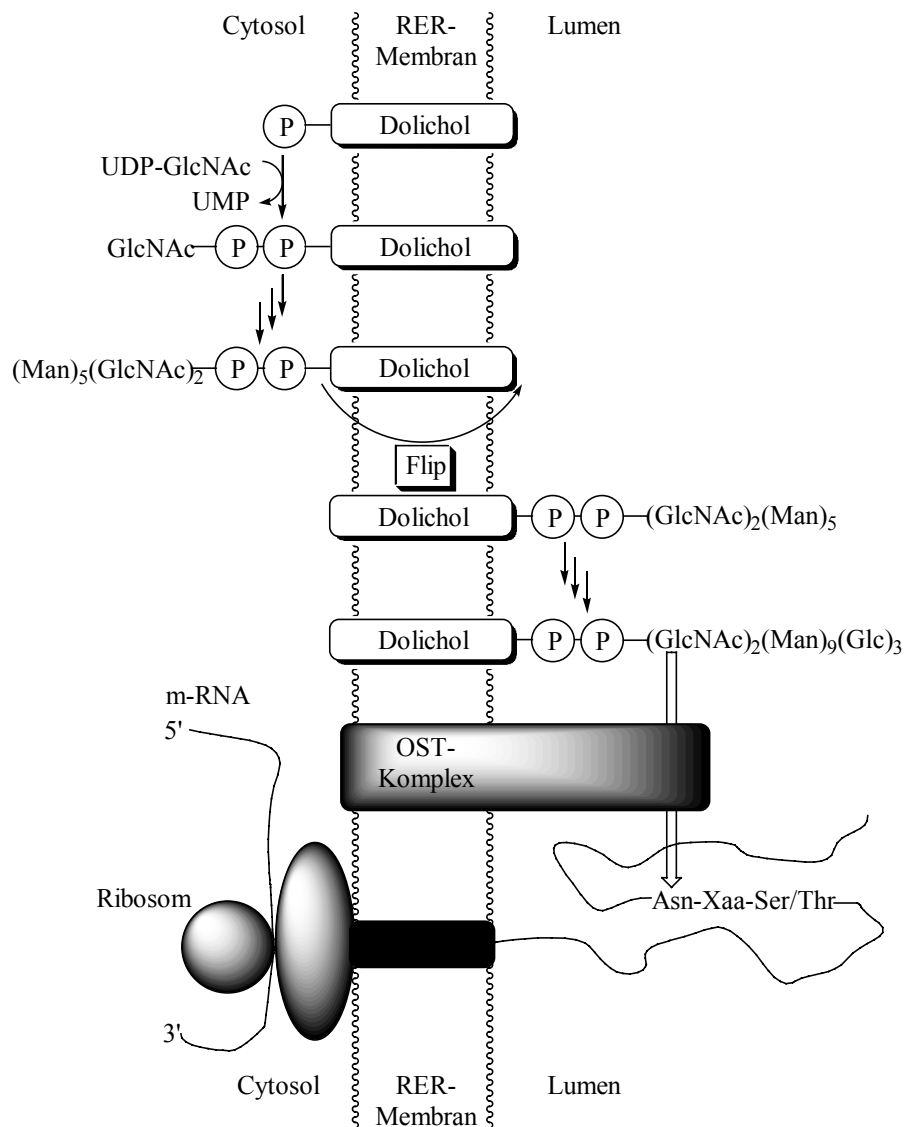


Abb. 2.2: Biosynthese des Tetradecamers (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂.

Durch eine membrangebundene Oligosaccharyltransferase (OST) im RER wird das Tetradecamer (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂ en bloc auf die naszierende Peptidkette übertragen, d.h. der Aufbau von *N*-Glycanen verläuft simultan mit der ribosomalen Peptidsynthese. Dieser cotranslationale Vorgang betrifft nur Asparaginreste innerhalb der Aminosäuresequenz

2. Einleitung

Asn-Xaa-Ser oder Asn-Xaa-Thr, wobei Xaa für eine beliebige Aminosäure außer Prolin steht.^[39,40]

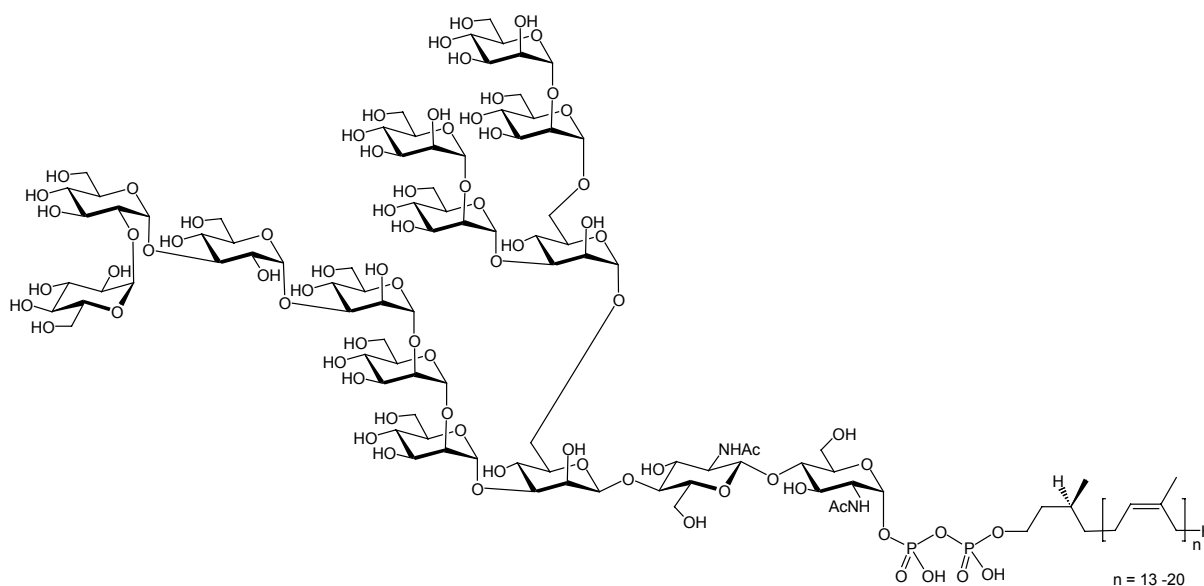


Abb. 2.3: Auf das nascierende Protein übertragene Tetradecamer.

Die *N*-Glycosylierung ist dabei für die Funktion eines Proteins zwar nicht immer erforderlich, fehlende *N*-Glycosylierung verhindert jedoch meist die korrekte Faltung der Peptidkette. Die Faltung wird einerseits durch den großen hydrophilen Rest des *N*-Glycans beeinflusst, zum anderen initiieren *N*-Glycane in Verbindung mit Chaperonen^[41,42,43,44] eine Qualitätskontrolle bei der Faltung von Glycoproteinen.^[36,40,45]

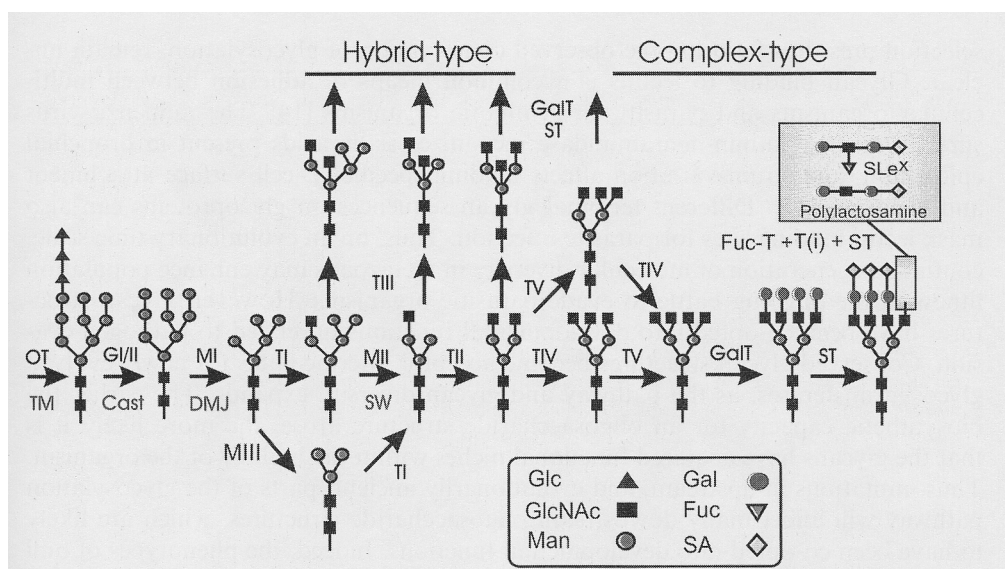


Abb. 2.4: Schematische Übersicht der *N*-Glycanbiosynthese und der dazugehörigen Glycosyltransferasen; OT: Oligosaccharyltransferase; G: α -Glucosidase; T: β -*N*-Acetylglucosaminyltransferase; M: Mannosidase; GalT: β -1,4-Galactosyltransferase; Fuc-T: α -Fucosyltransferase; ST: α -Sialyltransferase; SW: Inhibierung durch Swainsonin (s.u.); Cast: Inhibierung durch Castanospermin.^[45]

Im Verlauf dieser Qualitätskontrolle werden zunächst die äußeren Glucosereste entfernt, und nach der Abspaltung von Mannoseeinheiten werden die Glycoproteine in den Golgi-Apparat transportiert.^[40] Dort wird durch diverse *N*-Acetylglucosaminyl-, Galactosyl- und Sialyltransferasen, die z.T. untereinander um gemeinsame Akzeptorsubstrate konkurrieren,^[46] eine Vielzahl von Strukturen aufgebaut.

Diese Strukturen können durch die Anwesenheit eines "bisecting"-*N*-Acetylglucosaminrestes oder einer Core-Fucosylierung weiter modifiziert werden. Somit weisen *N*-Glycane trotz des gemeinsamen Core-Pentasaccharids eine große Vielfalt von Grundstrukturen auf, die ihrerseits weiter modifiziert sein können.

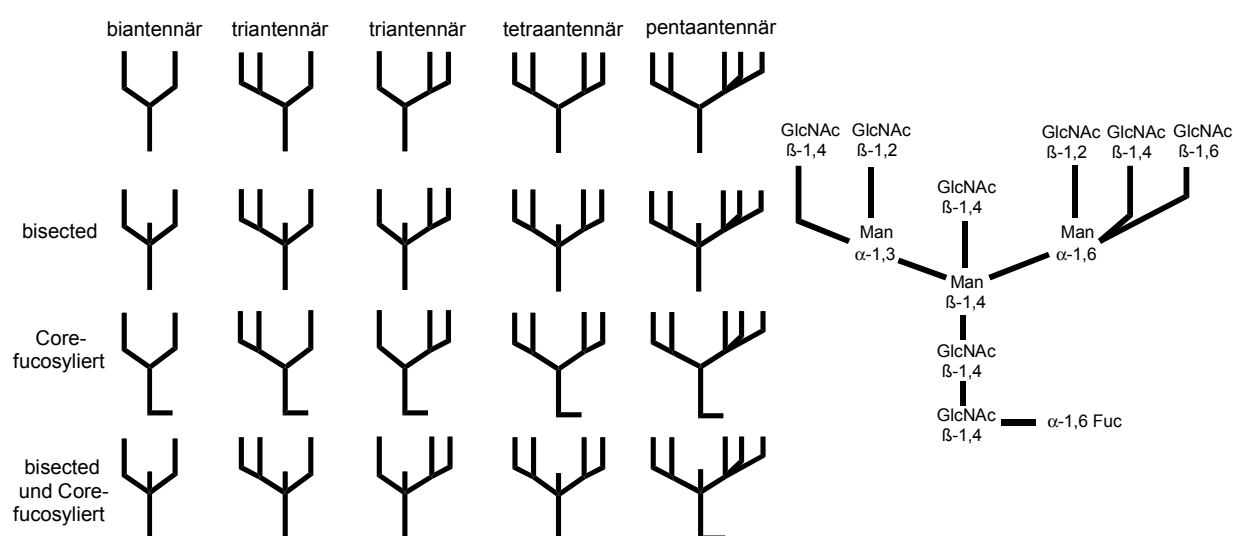


Abb. 2.5: Grundstrukturen komplexer *N*-Glycane.

Da z.B. nach der Galactosylierung mehrere Glycosyltransferasen um die einzelnen terminalen Glycosylierungsstellen konkurrieren, werden selten Strukturen mit homogenen Termini gefunden; meist entstehen *N*-Glycane mit heterogenen Termini. Neben neuartigen Verzweigungen können auch zusätzliche Modifikationen wie Sulfatierung, Phosphorylierung oder Acetylierung an verschiedenen Stellen auftreten, wodurch sich eine fast beliebig große Zahl von möglichen *N*-Glycanstrukturen ergibt.

2.1.2 Core-Modifikationen von *N*-Glycanen

Über die oben angeführten Grundstrukturen komplexer *N*-Glycane hinaus werden weitere, zum Teil seltene Core-Modifikationen von *N*-Glycanen in Pflanzen, niederen Organismen, Säugetieren und zunehmend auch in Linien von Zellmutanten gefunden.

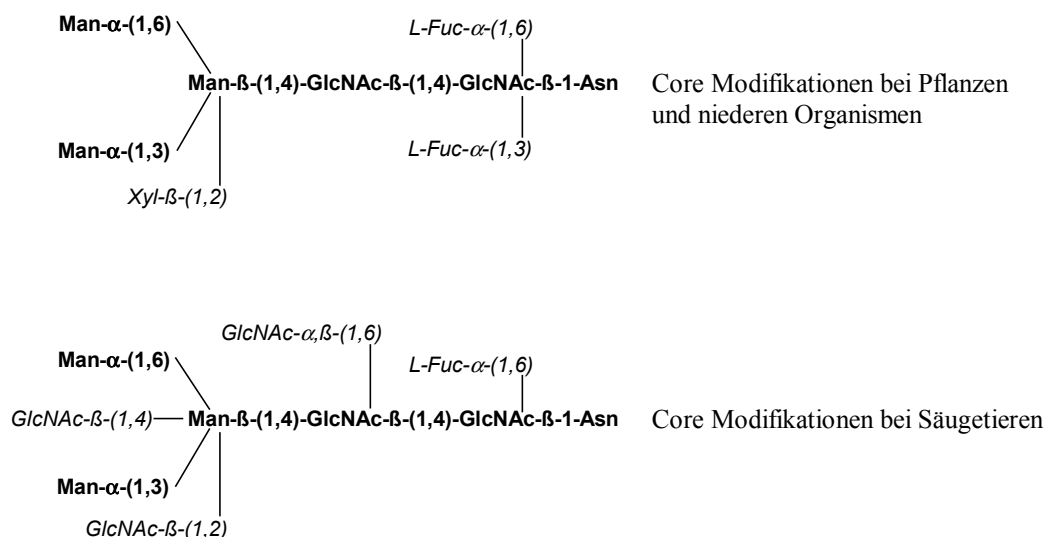


Abb. 2.6: Mögliche Modifikationen der Corestruktur von *N*-Glycanen; das allen Strukturen gemeinsame Core-Pentasaccharid ist hervorgehoben.

Dabei ist allen Modifikationen (**Abb. 2.6**) die Pentasaccharid-Corestruktur ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) gemeinsam, die bei Pflanzen und einigen niederen Organismen durch Anbringen eines Fucoserestes in α -(1,6)- oder α -(1,3)-Position am reduzierenden Ende, oder durch β -(1,2)-gebundene Xylose am Core-Trisaccharid-Mannosebaustein variiert werden kann.^[47,48] In Säugetieren kann das Core-Pentasaccharid am reduzierenden Ende durch α -(1,6)-Core-Fucosylierung, durch einen "bisecting" *N*-Acetylglucosaminrest oder durch α,β -(1,6)-Verknüpfung eines *N*-Acetylglucosaminrestes mit dem nicht reduzierenden *N*-Acetylglucosaminrest der zentralen Chitobiose modifiziert werden.^[47]

Seltene Core-Modifikationen wurden in Zellmutanten gefunden. So zeigen CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) nur einen geringen Teil der bekannten Glycosyltransferaseaktivitäten. Hingegen fehlen einige bestimmte Fucosyltransferasen, Galactosyltransferasen, Sialyltransferasen oder *N*-Acetylglucosaminyltransferasen. Jedoch können als Folge von Mutagenese oder Transfektion mit großen Mengen an DNA auch seltene Mutanten erhalten werden, die eine neue Transferaseaktivität besitzen.^[49]

Zur Isolierung von Glycosylierungsmutanten von Säugetierzellen können toxische pflanzliche Lectine verwendet werden. Die überwiegende Mehrheit von lectinresistenten Mutanten überlebt die Selektion durch Synthese von verkürzten Glycanstrukturen. Diesen fehlen die für die Anbindung der Lectine an die Zelloberfläche notwendigen Zuckerreste. Die meisten dieser Mutanten haben eine Glycosylierungsaktivität verloren; in solchen Mutanten ist zumindest ein Biosyntheseweg eingefroren, so daß ein Glycosylierungsintermediat isoliert und strukturell aufgeklärt werden kann.

Dabei wird zwischen rezessiven und dominanten Glycosylierungsmutanten unterschieden. Rezessive Glycosylierungsmutanten haben mindestens eine bestimmte Glycosylierungsaktivität verloren. Dominante Mutanten hingegen rufen eine Glycosylierungsreaktion hervor, die in den Elternzellen nicht auftritt. So besitzt das CHO-Genom stille Glycosyltransferasegene, die aufgrund eines mutationsgleichen Ereignisses aktiviert werden können und so Zugang zu neuen Glycosyltransferasen bieten können. Zwei CHO-Glycosylierungsmutanten, LEC14^[47] und LEC18,^[48] sind in letzter Zeit genauer untersucht worden. Es wurde dabei gefunden, dass sie *N*-Glycane mit neuer, bisher nicht beobachteter Corestruktur synthetisieren. Diese Strukturen wurden von der Gruppe um *P. Stanley* erstmals beschrieben.^[47,48]

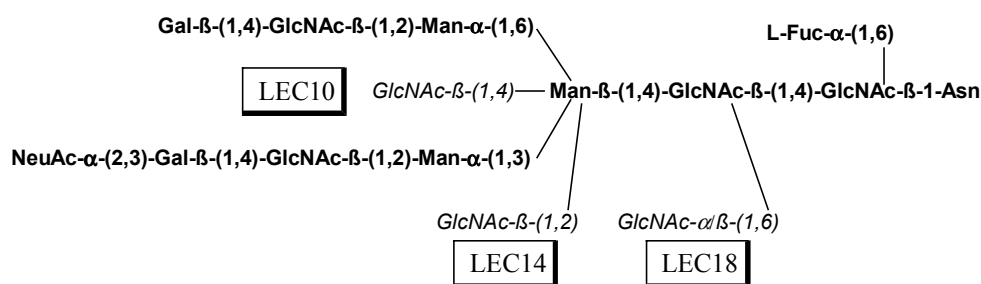


Abb. 2.7: Überblick über einige Modifikationen der Core-Pentasaccharidstruktur.

Inzwischen sind einige LEC-Strukturen aufgeklärt worden (Überblick s. **Abb. 2.7**). Die Wahrscheinlichkeit, dass noch andere stille, aber möglicherweise funktionelle Glycosyltransferasegene in CHO-Zellen gefunden werden können, ist hoch.^[49]

2.1.3 Biologische Rolle der *N*-Glycane

Die Untersuchung der biologischen Eigenschaften von *N*-Glycanen gestaltet sich z.T. äußerst schwierig. Die biologischen Folgen einer Veränderung im Glycosylierungsmuster fallen sehr unterschiedlich aus und sind selten vorhersagbar. Darüber hinaus kann es auch passieren, dass Veränderungen im Glycosylierungsmuster kultivierter Zellen sich nur im Gesamtorganismus auswirken und somit bei isolierter Betrachtung der Zelllinien nicht bemerkt werden. Da *N*-Glycane auch als Ansatzpunkte für Pathogene und Toxine dienen, haben Zellen durch den evolutionsbedingten Druck eine große Vielzahl von Strukturen und Modifikationen geschaffen, von denen zumindest ein Teil als "evolutionsbedingte Diversität" betrachtet wird. Ansätze zur Aufklärung der biologische Rolle von *N*-Glycanen beinhalten die vollständige Verhinderung der Glycosylierung, Veränderung der Oligosaccharidprozessierung, den enzymatischen oder chemischen Abbau von Glycoproteinen und Sacchariden, genetische Eliminierung von Glycosylierungsstellen, und die Untersuchung natürlich auftretender

Variationen und genetischer Mutanten bezüglich der Glycosylierung. Dabei sind wohldefinierte *N*-Glycanstrukturen unentbehrlich. Sie dienen zur Aufklärung oder Absicherung von natürlichen Strukturen oder zur Bereitstellung von definierten Neoglycoproteinen für Zelltests und Affinitätsuntersuchungen.

Ganz grob kann zunächst eine Einteilung von *N*-Glycanen bezüglich ihrer biologischen Eigenschaften in zwei Gruppen vorgenommen werden. Zum einen werden die strukturellen und modulatorischen Eigenschaften von *N*-Glycanen betrachtet. Sie dienen beispielsweise als Schutz vor Proteasen, der Stabilisierung und Faltung von Proteinen und wirken sich auf viele physikalische Eigenschaften der betreffenden Glycoproteine wie z.B. Löslichkeit, Ladung und Serumhalbwertszeit aus.

Zum anderen wird die spezifische Erkennung von *N*-Glycanen durch andere Moleküle wie z.B. Lectine betrachtet. *N*-Glycane wirken als Erkennungsstrukturen für eine Vielzahl von Viren, Bakterien, Parasiten, für viele pflanzliche und bakterielle Toxine und dienen auch als Antigene für Autoimmunreaktionen.

Diese biologische Erkennung lässt sich weiter unterteilen in die Erkennung durch endogene Rezeptoren im selben Organismus und die Erkennung durch exogene Stoffe. Diese erfolgt meist durch Pathogenrezeptoren und Toxine, kann aber auch Symbiosemechanismen (siehe NOD-Faktoren, Kapitel 2.2) beinhalten. Eine generelle Einteilung wird aber durch den Umstand erschwert, dass ein bestimmtes Glycan verschiedene Aufgaben in verschiedenen Gewebetypen oder in unterschiedlichen Entwicklungsstadien haben kann.^[50]

Beispiele für die Bedeutung von *N*-Glycanen sind mannigfaltig:

- *N*-Glycane mit der Zusammensetzung $(\text{Glc})_1(\text{Man})_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$ werden hochspezifisch von Calnexin und Calreticulin erkannt, die als Faltungshelfer im ER bei der Biogenese von Glycoproteinen essentiell sind und mit einer Vielzahl von Glycoproteinen assoziieren. Durch die Assoziation wird die korrekte Faltung des betreffenden Proteins sichergestellt, nicht korrekt gefaltete Proteine werden im ER zurückgehalten.^[51,52,53]
- Immunglobuline, MHC-Moleküle und die betreffenden Rezeptoren sind Glycoproteine. Ihre *N*-glycosidisch verknüpften Oligosaccharide sind in erster Linie wichtig für die Biosynthese und Faltung.^[54] Neuere Erkenntnisse weisen aber auch darauf hin, dass *N*-Acetylglucosaminreste im *N*-Glycanteil von IgG erkannt werden und bei Immunreaktionen eine Rolle spielen.^[55] Zum Beispiel ist die Glycosylierung bei rheumatischer Arthritis zu Glycoformen hin verschoben, bei denen weniger terminale Galactosen gefunden werden und somit die *N*-Acetylglucosaminreste freiliegen.^[56]

- Viruspartikel besitzen üblicherweise ein oder mehrere Oberflächenprotein(e), von denen die Mehrzahl *N*- oder *O*-glycosidisch modifiziert ist. Diese Glycoproteine spielen eine Schlüsselrolle bei der Infektion durch Herstellen des ersten Kontakts mit Rezeptoren der Wirtszelle, Anbindung und anschließendes Verschmelzen der viralen und zellulären Membranen, später auch beim Zusammensetzen der Viruspartikel in der Wirtszelle und der Sekretion. So ist das Hüllprotein gp 120 von HIV-1 aus infizierten T-Lymphocyten^[57] oder transfizierten Chinese Hamster Ovary cells (CHO)^[58] sehr stark *N*-glycosyliert (50 % des Molekulargewichts des Hüllproteins bestehen aus Kohlenhydraten). Inhibitoren der *N*-Glycosylierung oder *N*-Glycanprozessierung weisen eine antivirale Wirkung auf, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der inkorrekten Faltung des neusynthetisierten, nicht glycosylierten HIV-1 gp 160 beruht, das den Vorläufer für gp 120 und das integrale Membranprotein gp 41 darstellt.
- Bei Krebs^[45,59] kann das Glycosylierungsmuster einen Ansatz zur Behandlung darstellen. So führen die molekularen Veränderungen infolge einer malignen Entwicklung zu einer Veränderung der Glycosylierung von Glycoproteinen und Glycolipiden. Das Interesse an dem Glycosylierungsmuster von Krebszellen beruht u.a. auf der Beobachtung, dass die Expression bestimmter Glycanstrukturen in Tumoren mit dem Fortschreiten der Krankheit korreliert.^[60,61]
- Die Alkaloide Swainsonin und Castanospermin verhindern die Metastase und die Invasion von Tumorzellen *in vitro*^[62] und *in vivo*^[63] durch kompetitive Inhibierung von Enzymen. Speziell Swainsonin inhibiert die im Golgi-Apparat angesiedelte α -Mannosidase II und blockiert einen Biosyntheseweg, der für die β -1,6-*N*-Acetylglucosaminverzweigung Voraussetzung ist, so dass lediglich *N*-Glycane vom Hybridtyp gebildet werden (vgl. **Abb. 2.4**).
- In verschiedenen Studien zeigten mutierte Zellen, die α -2,6-Sialyltransferase überexprimierten, 3 – 10 mal weniger Metastasen und ein 60 % langsames Tumorstadium. Die Mutanten hatten vorwiegend α -2,6-verknüpfte Neuraminsäuren anstelle von α -2,3-verknüpften Neuraminsäuren (Wildtyp) auf der Zelloberfläche.^[64,65] Ebenso verringerte die Transfektion einer anderen Zelllinie mit α -2,6-Sialyltransferase das invasive Potential.^[66]
- B16 Melanom-Mutanten, bei denen aufgrund der Überexpression von α -1,3-Fucosyltransferase die Sialylierung gänzlich unterdrückt war, verringerten ihr metastatisches Potential.^[67] Eine vergleichbare Wirkung wurde erzielt, wenn die Zellen entweder mit α -1,2-Fucosyltransferase oder α -1,3-Galactosyltransferase transfiziert wurden.^[68]

N-Glycane spielen somit in der Natur eine wichtige Rolle auf vielen unterschiedlichen Gebieten, was aufgrund des beobachteten enormen strukturellen Variantenreichtums nicht verwundert. Die Strukturvielfalt der *N*-Glycane kann Glycoproteinen große funktionelle Diversität verleihen und erhöht dadurch äußerst effektiv die Anzahl der biologischen Aktivitäten für ein einzelnes Genprodukt.

2.2 NOD-Faktoren

Auch im Pflanzenreich sind Kohlenhydrate in fast allen Bereichen essentiell; so stellt Zellulose sowohl bezüglich ihrer Menge als auch der Verbreitung das häufigste und bedeutendste Biopolymer in der Natur dar.^[69] Neben der Funktion als Energiespeicher sind Kohlenhydrate darüber hinaus auch hier wieder an Erkennungsprozessen beteiligt.^[70] So dienen NOD-Faktoren bei der Symbiose zwischen nitrifizierenden Knöllchenbakterien, den Rhizobien, und Leguminosen als Botenstoffe.^[71,72,73]

2.2.1 Die Rhizobien-Leguminosen-Symbiose

Bei Stickstoffmangel sendet die Wirtspflanze Flavonoide als Signalstoffe aus. Diese induzieren eine Chemotaxis der Rhizobien zu den Wurzeln hin. Die Rhizobien binden hauptsächlich an die entstehenden Wurzelhaare, und zwar nahe der neuwachsenden Wurzelspitze.^[73,74]

Rhizobien sekretieren ihrerseits Signalstoffe, die sogenannten NOD-Faktoren (lat.: „nodus“ = „Knöllchen“). Diese lösen verschiedenartige Veränderungen aus, wie Wurzelhaardeformationen, -verzweigungen und -krümmungen. Die Wurzelhaarkrümmungen entstehen vermutlich durch einseitige Inhibierung des Wurzelhaarwachstums im Bereich der Rhizobienkolonie, wobei die Rhizobien dabei in der Beuge der Krümmung eingeschlossen und an die Zellwand gedrückt werden. In diesem Bereich wird die Wirtszellwand lokal aufgelöst. Durch diese Öffnung dringen Rhizobien in das Wurzelhaar ein, bleiben aber weiterhin durch die Plasmamembran der Wirtszelle vom Zytoplasma getrennt. Die Wirtszelle lagert um die Infektionsstelle neues Wandmaterial ab. Die entstehende tunnelartige, an der Spitze offene Struktur, der Infektionsschlauch, durchdringt die Wurzelhaarzelle. Trifft der Infektionsschlauch auf eine Zellwand, so lösen die Rhizobien diese auf und dringen durch die neu entstandene Pore in die Nachbarzelle ein. Dabei führen nur wenige Infektionen zu einer Knöllchenbildung, die meisten Infektionsschläuche jedoch enden noch in der infizierten Wurzelhaarzelle selbst oder innerhalb der ersten Cortexzellschichten und lösen keine Knöllchenbildung aus.^[71,72,73]

2. Einleitung

Durch die NOD-Faktoren werden außerdem bei der Wirtspflanze gleichzeitig Zellteilungen im inneren Cortex induziert; erreicht der Infektionsschlauch diese meristematischen Zellen, so verzweigt er und wächst unter weiteren Verzweigungen in das Gewebe ein. Die Schläuche dringen in die jungen Knöllchenzellen ein und entlassen die Rhizobien in die Zellen. Dabei werden die Bakterien in einem phagozytoseähnlichen Prozess mit einer Peribakteroidmembran, die sich vom Wirtsplasmalemma ableitet, umschlossen und ins Wirtszytoplasma entlassen. Diese Rhizobien differenzieren zu reifen Bakteroiden, die atmosphärischen Stickstoff fixieren; die Einheit aus Bakteroid und Peribakteroidmembran wird auch als „Symbiosom“ bezeichnet. Die Bakterioide vermehren sich im Wirtszytoplasma rasch, wobei die Bakterioide bei der Zellteilung weiterhin die Peribakteroidmembran behalten. Die aeroben Bakterioide werden von der Wirtspflanze mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, der von den Bakteroiden aus dem Luftstickstoff erzeugte Ammoniak wird in den Knöllchenzellen in Aspartat bzw. Glutamat eingebaut und als Asparagin bzw. Glutamin in das übrige Pflanzengewebe exportiert.

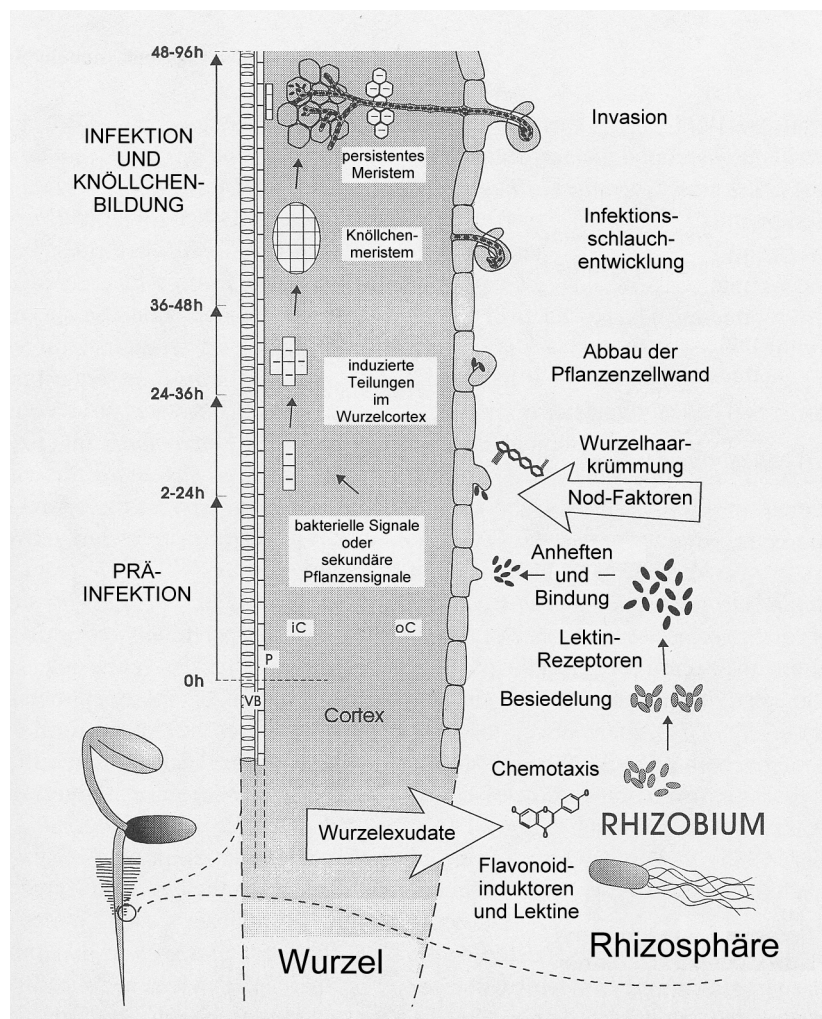


Abb. 2.8: Beginn der Rhizobien-Leguminosen-Symbiose.^[71,72]

2.2.2 Biosynthese

Sowohl auf der rhizobiellen wie auch auf der pflanzlichen Seite wurde in den letzten Jahren eine große Zahl von Symbiosegenen identifiziert. Dabei besitzen Rhizobien sowohl konservierte „common“ *nod*-Gene (*nodABC*, *nodD*), die in allen bisher untersuchten Rhizobien gefunden wurden, wie auch für einzelne Stämme charakteristische, d.h. wirtsspezifische *nod*-Gene. Darüber hinaus wurden weitere, mit der Knöllchenbildung in Zusammenhang stehende Gene (*nol*- und *noe*-Gene) gefunden, über deren Funktion noch wenig bekannt ist. Diese Gene sind notwendig für die Infektion, Knöllchenbildung und die Kontrolle der Wirtsspezifität. Dass die NOD-Faktoren bzw. *nod*-Gene der Rhizobien für die Knöllchenbildung essentiell sind, wird durch die Beobachtung der Knöllchenbildung bei *nod*-Defektmutanten belegt. Die Inaktivierung der „common“-*nod*-Gene (*nodABC*, *nodD*) verhindert die Knöllchenbildung vollständig, die Inaktivierung der übrigen *nod*-Gene führt zu einer verzögerten und weniger effizienten Knöllchenbildung oder auch zu einem veränderten Wirtsbereich. Die Zugabe eines isolierten NOD-Faktors ermöglicht einigen Defektmutanten dennoch eine erfolgreiche Knöllchenbildung.^[72,73,75,76,77,78,79]

Das Wurzelexudat und Samen der Wirtspflanze beinhalten Substanzen, die beim spezifischen Rhizobienstamm die Transkription der *nod*-Gene stimulieren. Diese *nod*-Induktoren bestehen aus Flavonen und Flavonoiden, die interessanterweise z.T. Phytoalexine darstellen und bei Abwehrreaktionen von Pflanzen eingesetzt werden. Durch die Aktivitäten der rhizobiellen „common“ *nodABC*-Genprodukte erfolgt der Aufbau von Lipochitooligosacchariden als gemeinsame NOD-Faktorvorstufe. Dabei besitzt das NOD-C Protein *N*-Acetylglucosamin- β -1,4-transferaseaktivität (Chitinsynthase), NOD-B *N*-Deacetylaseaktivität an terminalen Zuckereinheiten von Chitooligomeren und NOD-A *N*-Acyltransferaseaktivität. Die daraus resultierende „common“ Corestruktur scheint das biosynthetische Intermediat aller NOD-Faktoren darzustellen. Sie wird durch die katalytische Aktivität der stammspezifischen *nod*-Gene zum jeweiligen wirtsspezifischen NOD-Faktor weiter modifiziert. Dabei kann der Wirtsbereich aufgrund der produzierten NOD-Faktorstrukturen sehr stark variieren und sogar nicht-Leguminosen umfassen. Die Biosynthese zweier rhizobieller NOD-Faktoren ist in **Abb. 2.9** schematisch wiedergegeben; einige Proteine sind speziell an der Biosynthese des Lipidanteils (z.B. NOD-E und NOD-F) beteiligt.^[73,75,77,78,79,80,81]

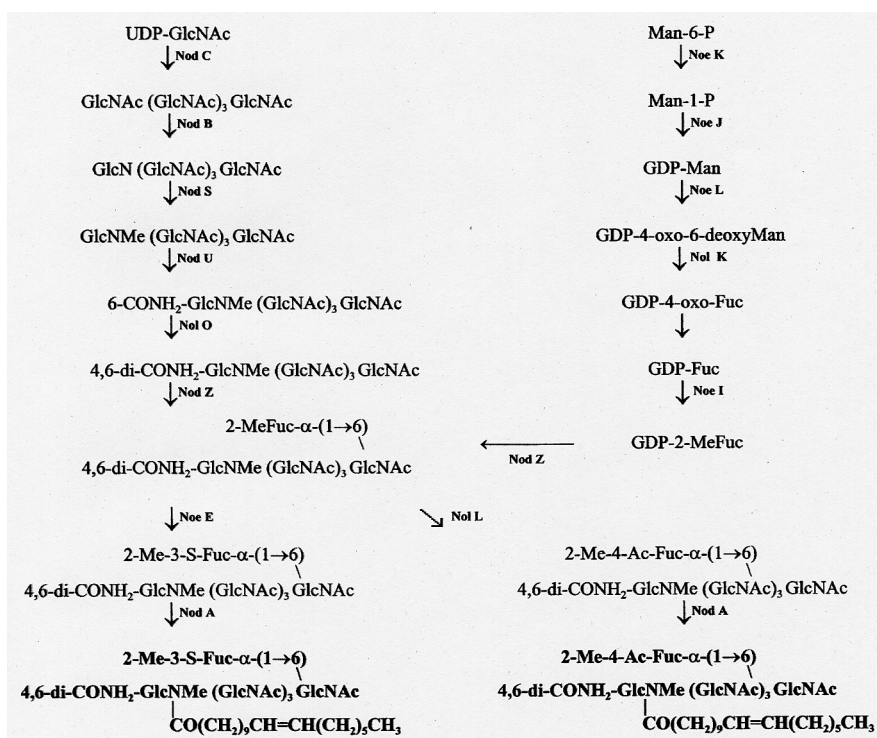


Abb. 2.9: Biosynthese zweier rhizobieller NOD-Faktoren.^[77]

2.2.3 NOD-Faktoren: gemeinsames Strukturmotiv und Modifikationen

Die ersten Strukturen von NOD-Faktoren wurden 1990 aufgeklärt.^[82] Alle bisher gefundenen NOD-Faktoren bestehen aus drei bis sechs *N*-acetylierten, β -1,4-verknüpften D-Glucosamineinheiten. Die am häufigsten gefundenen Strukturen beinhalten vier bis fünf Glucosamineinheiten, wobei aus Experimenten hervorgeht, dass die Kettenlänge den Wirtsbereich mitbestimmt.^[73,75,80]

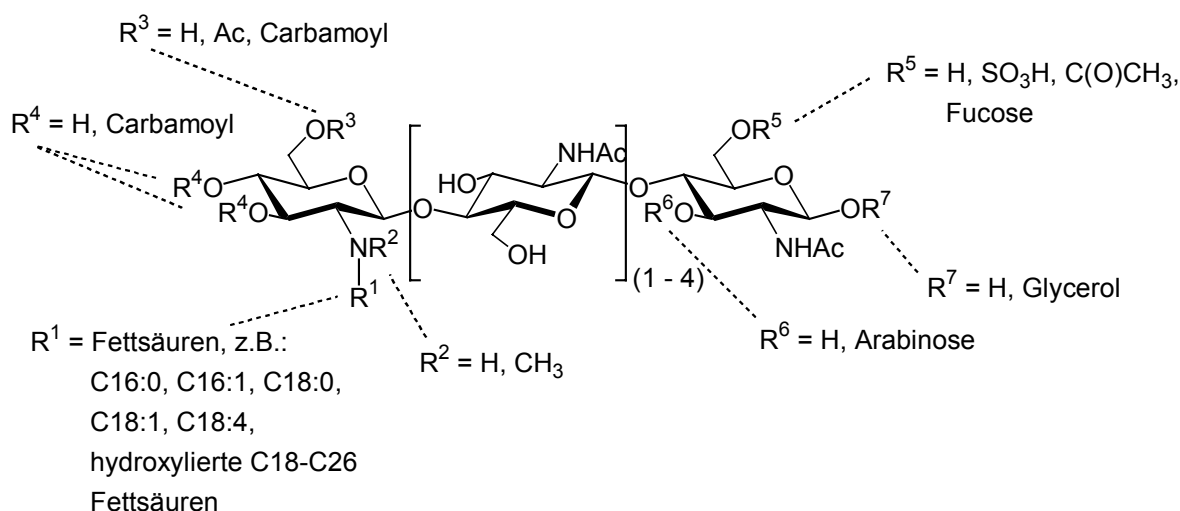


Abb. 2.10: Einige Variationen der Substituenten der NOD-Faktoren. Sie bestimmen die Wirtsspezifität und viele weitere Eigenschaften der dazugehörigen Rhizobienstämme.

Alle NOD-Faktoren besitzen am nichtreduzierenden Ende eine *N*-Acylseitenkette, wobei die gesättigten und ungesättigten Fettsäurereste bei den Stämmen variieren und zur Wirtsspezifität beitragen. Bei den meisten Rhizobien ist die Aminogruppe der NOD-Faktoren mit einer herkömmlichen Fettsäure acyliert und kann auch eine Methylgruppe als zweiten Substituenten aufweisen. In einigen Stämmen treten auch mehrfach ungesättigte ungewöhnliche Fettsäuren auf, die unter Kontrolle der *nod*-Gene synthetisiert werden. Die am häufigsten gefundenen herkömmlichen Fettsäuren ähneln der Zusammensetzung von Membranlipiden. Vor allem Palmitin- (C16:0), Palmitolein- (C16:1), Stearin- (C18:0) und *cis*-Vaccensäure ((Z11)-C18:1) wurden isoliert. Bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren treten hauptsächlich C18-Kohlenstoffketten (v.a. (E2,4,6,Z11)-C18:4) und C-20-Fettsäuren mit *cis*- bzw. *trans*-Doppelbindungen auf. Die NOD-Faktoren von *R. meliloti* können mit einer Reihe von C18 bis C26(ω -1)-hydroxylierten Fettsäuren acyliert sein, die sehr wahrscheinlich Vorläufer der im LipidA von *R. etli* gefundenen C28(ω -1)-hydroxylierten Säuren sind. Dabei bestimmen die Länge der Kohlenstoffkette sowie die Anzahl der Doppelbindungen und deren *cis*- oder *trans*-Konfiguration in ganz entscheidender Weise den Wirtsbereich. Chitooligomere ohne Fettsäurerest sind in allen bisherigen Tests gänzlich inaktiv. Es wird vermutet, dass die Fettsäurereste u.a. dazu dienen, durch ihre hydrophoben Eigenschaften die Insertion des Moleküls in die Lipiddoppelschicht der pflanzlichen Plasmamembran zu ermöglichen. Dies würde den Weg zu einem eventuellen Rezeptor erleichtern und gleichzeitig das Molekül orientieren, so dass Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen möglich werden. *N*-Acylierung könnte auch dem biologischen Abbau des Moleküls entgegenwirken.^[73,75,76,77,80,83,84,85]

Weitere Modifikationen finden am Glucosamin des nichtreduzierenden Endes statt, hauptsächlich in Position 6. Hier wird *O*-Acetylierung beobachtet, aber auch Carbamoylgruppen in den Positionen 6, 3 und 4.^[75,76,80]

Die am reduzierenden Ende beobachteten Modifikationen sind entscheidend für die Wirtsspezifität. Rhizobien, wie *R. tropici*, die sowohl nicht-sulfatierte wie auch sulfatierte NOD-Faktoren produzieren, besitzen einen extrem großen Wirtsbereich. Wesentlich seltener wird Acetylierung oder *O*-Glycosylierung beobachtet.^[73,75,76,84]

Darüber hinaus werden sehr seltene und ungewöhnliche Modifikationen des reduzierenden Endes beobachtet. So wurde ein Glycosid mit Glycerol gefunden. Diese Modifikation wird aufgrund ihrer geringen Menge im Wildtypstamm z.Z. aber als Produkt einer Mutation oder als biosynthetischer Vorläufer des betreffenden NOD-Faktors diskutiert. In letzter Zeit wurden auch andere Zuckereinheiten als *N*-Acetylglucosamin in der chitooligomeren

Corestruktur beschrieben, darunter eine Mannose am reduzierenden Ende und eine Glucose innerhalb der Corestruktur. Auch von einer α -1,3-L-Fucosylierung einer *N*-Acetylglucosamin-einheit innerhalb der Corestruktur wird berichtet. Die biologischen Bedeutungen dieser Exoten sind noch nicht bekannt, möglicherweise dienen sie dem Schutz der NOD-Faktoren vor enzymatischem Abbau durch die Wirtspflanze oder durch andere Organismen im Lebensraum der Rhizobien.^[75,76,77]

Alle Rhizobienstämme produzieren jeweils nicht nur einen bestimmten, sondern ein Gemisch von NOD-Faktoren. Diese Gemische sind in Pflanzentests häufig etwas aktiver als einzelne isolierte oder synthetisierte Verbindungen. Ob diese Strukturvielfalt der jeweils produzierten NOD-Faktoren zur Erweiterung des Wirtsbereiches dient, oder ob verschiedene Strukturen für mehrere verschiedene Signalwege in einem bestimmten Wirt notwendig sind und synergistische Effekte aufweisen, ist noch nicht bekannt.^[73,75,77,80,84]

2.2.4 NOD-Faktoren: Wirkungsweise und Bedeutung

Um die Wirkungsweise der NOD-Faktoren besser verstehen zu können, wurden bereits ausgewählte NOD-Faktoren synthetisiert.^[11,12,13,14] Die erste Synthese stammt aus dem Jahr 1992 von Nicolaou^[11] und lieferte den Hauptfaktor von *R. meliloti*. Dies ist ein Glucosamintetramer mit dem Acylrest C16:2; es wurde mit bzw. ohne Acetylrest in Position 6 des nichtreduzierenden Endes und mit bzw. ohne Sulfatgruppe in Position 6 am reduzierenden Ende synthetisiert.^[11] Die dargestellten Verbindungen wurden für Pflanzentests verwendet und haben viel zum Verständnis des Substituenteneinflusses auf die Wirtsspezifität und die Wirkung der NOD-Faktoren auf die entsprechenden Pflanzen beigetragen (s. oben).

Die Synthese von Chitooligosacchariden, Lipochitooligosacchariden und Derivaten wird in letzter Zeit auch unter Verwendung von Zellextrakten und gereinigten NOD-Enzymen durchgeführt. Jedoch ist die enzymatische Synthese bisher noch nicht geeignet, um unnatürliche Strukturen in größerer Menge darzustellen. Isolierte, natürliche NOD-Faktoren werden vermehrt chemisch oder chemo-enzymatisch mit Markermolekülen, meist Fluoreszenzmarkern, modifiziert, um die Aufnahme in die Pflanze und Signalübertragungswege zu untersuchen.^[75,86]

Isolierte NOD-Faktoren lösen nach mindestens zehnminütiger Inkubation in nanomolaren und teilweise sogar picomolaren Konzentrationen an ihren Wirtspflanzen Wurzelhaardeformationen aus, die innerhalb von ein bis drei Stunden detektierbar sind. Die Transkription einer Vielzahl von Pflanzengenen, die während der frühen Schritte in der Symbiose eine Rolle spielen, wird durch NOD-Faktoren induziert. Dabei ist die Anwesenheit eines langkettigen

Acylrestes unbedingt erforderlich, da Chitooligosaccharide allein unwirksam sind. Die Gegenwart von Doppelbindungen scheint, ebenso wie die *O*-Acetylgruppe in Position 6 des nichtreduzierenden Endes, nicht notwendig zu sein. Hingegen erscheint das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Sulfat oder Fucose am reduzierenden Ende extrem wichtig, ebenso wie die Oligomerenlänge. Nur Tetramere und Pentamere sind aktiv und ihre Aktivität relativ zueinander variiert mit dem Wirt.^[75,76]

Der Zusatz von NOD-Faktoren bewirkt auch eine Depolarisierung des Plasmamembranpotentials bei Wurzelhaarzellen. Dabei wird ein Protonenaustritt und das Einströmen von Ca^{2+} -Ionen beobachtet, gefolgt von einem Cl^- - und einem K^+ -Ausfluss, der die Ladung kompensiert. Auch sich wiederholende Schwankungen im Calciumspiegel (sog. „calcium-spiking“) werden durch NOD-Faktoren induziert. Die Neuordnung der Aktinfilamente ist ein Anzeichen für eine rasche Umordnung des Cytoskeletts. Diese Veränderungen treten 15 Sekunden bis 30 Minuten nach Zugabe der NOD-Faktoren auf. Hierbei ist jedoch – im Gegensatz zu den Wurzelhaardeformationen – die Gegenwart von Doppelbindungen notwendig. Das von *R. l. viciae* abgegebene Protein NOD-O kann dabei die bei einigen NOD-Faktoren fehlenden Doppelbindungen kompensieren.^[75,76,80,81,87,88,89]

Auch der Spiegel spezifischer Flavonoide, die von der Wirtspflanze im Wurzelexudat abgesondert werden, wird durch NOD-Faktoren erhöht. Hierfür sind die strukturellen Anforderungen sehr streng.^[75]

Im Wurzelcortex ebenen isolierte NOD-Faktoren die Infektionsschlauchbildung und bewirken die Induzierung von Mitosen. Bei Rhizobien, die Klee und Wicken besiedeln, sind die strukturellen Anforderungen für die Infektionsschlauchbildung viel strenger als für Wurzelhaardeformationen. Darüber hinaus wurde gefunden, dass NOD-Faktoren zwar notwendig, aber alleine nicht ausreichend für die Infektionsschlauchbildung sind.^[88]

Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass es zumindest bei diesen Leguminosen zwei unterschiedliche Rezeptoren gibt: einen „Signalrezeptor“ für die Induzierung der Wurzelhaardeformationen, und einen „Eingangsrezeptor“, der nur durch Moleküle mit ganz spezifischen Strukturen aktiviert werden kann und bei dem Eindringen der Rhizobien und der Infektionsschlauchbildung involviert ist.^[75,88] Mittlerweile sind einige pflanzliche Proteine gefunden worden, die eine starke Bindung mit NOD-Faktoren eingehen und potentielle Rezeptoren darstellen.^[88] Es sind auch Hinweise gefunden worden, die für eine Signalübertragung mittels G-Proteinen sprechen.^[90] Eindeutige Beweise stehen aber immer noch aus.^[88,91]

Äußerst interessant sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von *Dazzo* und *Hollingsworth*,^[92] die mit Fettsäuren *N*-acyliertes Glucosamin als Minimalstruktur vorschlagen und damit von der Literatur abweichen. Aus anderen Studien ist bekannt, dass NOD-Faktoren auch von nicht-Leguminosen aufgenommen werden und in diesen Pflanzen Reaktionen induzieren. Weitere Studien zeigen, dass die Lipochitooligomeren aus *R. etli* und *R. loti* übereinstimmen, obwohl die Wirtsbereiche definitiv unterschiedlich sind und nicht überlappen.^[92] Darüber hinaus wurde gefunden, dass die isolierten NOD-Faktoren aus einem Wildtypstamm wirtsspezifische Antworten induzieren, und unverändert in einer Mutante sind, obwohl eine größere Veränderung im Wirtsbereich zwischen Mutante und Wildtypstamm stattgefunden hat.^[93,94] Für die Autoren ist die in weiten Bereichen große strukturelle Übereinstimmung der NOD-Faktoren verschiedener Rhizobienstämme nicht mit dem meist sehr unterschiedlichen Wirtsbereich dieser Stämme vereinbar.

Aufgrund dieser Studien stellt sich die Frage, inwieweit die strukturellen Modifikationen der NOD-Faktoren für Aufnahme und biologische Aktivität in den betreffenden Leguminosen bedeutend sind.^[92] Um die biologische Aktivität zu untersuchen, wurden deshalb von *Dazzo* und *Hollingsworth* zwei Glucosaminderivate mit C16:2 und C16:0-Fettsäureresten, und *N*-acyliertes 2-Amino-1,3-dihydroxypropan als kohlenhydratfreies Analogon mit polarer Kopfgruppe synthetisiert. Um die Aufnahme in die Pflanze zu verfolgen, wurden NOD-Faktoren eines Wildtypstammes und das synthetische Monoglycosylanalogon mit C16:0-Fettsäurerest mit einem Fluoreszenzmarker versehen.

Als Pflanzensysteme wurden *Trifolium repens* (Weissklee) und *Medicago sativa* (Luzerne) verwendet. Dabei wurde gefunden, dass beide Monoglycosylanaloga (C16:2 und C16:0) Zellteilungen im Cortex und Wurzelhaardeformationen bei beiden Pflanzen auslösen, wenn sie in einer Konzentration von 10^{-7} M aufgebracht werden. Bei einer Verdünnung von 10^{-9} M hingegen ist für beide Analoga nur eine schwache Reaktion bei *Trifolium repens* zu finden, bei *Medicago sativa* allerdings scheint das Analogon mit der Doppelbindung die Zellteilungen effektiver zu induzieren. *N*-Acyliertes 2-Amino-1,3-dihydroxypropan ist hingegen bei keinem Test aktiv. Somit wäre aufgrund dieser Befunde ein Acylmonoglycosid ein ausreichender Informationsträger zumindest für diese Art von Pflanzenantworten. Die Aufnahme dieser unspezifischen Monoglycoside ist nicht mit einem restriktiven, spezifischen Rezeptor in Leguminosen vereinbar. Daher postulierten *Dazzo* und *Hollingsworth*, dass die Aufnahme entweder über einen unspezifischen Rezeptor, der nur Grundmerkmale von NOD-Faktoren wie z.B. Acylglycoside erkennt, erfolgt, oder die Substanzen aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften spontan in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eingelagert werden. In

diesem Falle könnten die Substitutionen der natürlich vorkommenden NOD-Faktoren ein Hindernis für die Aufnahme der Substanzen darstellen und so ihre Wirtsspezifität erklären.^[92] Obwohl seit vielen Jahren die Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen Gegenstand zahlreicher Studien ist und die Forschung auch sehr große Fortschritte gemacht hat, sind wir noch weit von einem umfassenden Verständnis entfernt. So konnten z.B. die postulierten Rezeptoren bisher nicht gefunden werden, und die Funktion des von Rhizobien produzierten Gemisches an verschiedenen NOD-Faktoren ist ebenso unklar wie die Signalübertragungswege.^[91] Somit ist weiterhin eine intensive Forschung auf diesem Gebiet notwendig, vor allem in Bezug auf eine erfolgreiche kommerzielle Anwendung von Rhizobien zur biologischen und damit umweltverträglicheren Düngung von Nutzpflanzen, wie z.B. der Sojabohne. Aber auch die Ausweitung der Symbiose von Rhizobien auf bisher nicht in den Wirtsbereich fallende Pflanzen, wie z.B. Reis, und die daraus resultierende Gründüngung ist vor dem Hintergrund der ständig wachsenden Erdbevölkerung und ihrer Versorgung von immenser Bedeutung.^[95]

2.3 Themenstellung

Zur Untersuchung der biologischen Eigenschaften von *N*-Glycanen und NOD-Faktoren sind wohldefinierte Substanzen essentiell. Deshalb sollte die kürzlich gefundene core-fucosylierte LEC14-Struktur mit der neuartigen β -1,2-Verknüpfung von *N*-Acetylglucosamin mit dem β -Mannosid des Core-Trisaccharids durch eine chemo-enzymatische Totalsynthese dargestellt werden. Die neuartige *N*-Glycanstruktur sollte anschließend durch den Einbau in ein Neoglycoprotein für biologische Untersuchungen verfügbar gemacht werden.

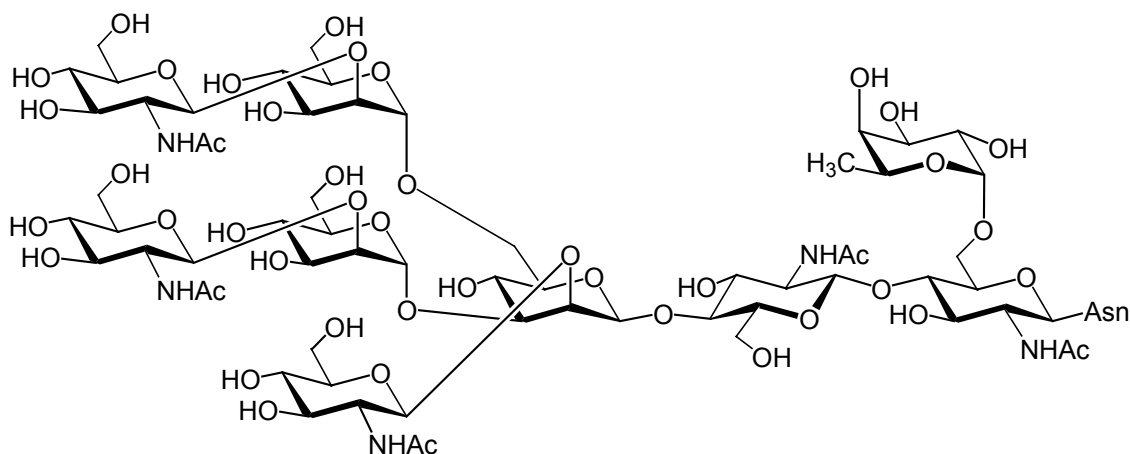


Abb. 2.11: Lec14-Struktur mit neuartiger Verknüpfung eines *N*-Acetylglucosaminrestes in Position 2'' des Core-Trisaccharids.

Weiterhin sollte ausgehend von vielseitig verwendbaren Bausteinen eine kurze, effiziente und universell einsetzbare Synthese zur Darstellung von oligomeren NOD-Faktoren aufgebaut werden. Der neue Syntheseweg sollte darüber hinaus einen leichten Zugang zu Derivaten bieten.

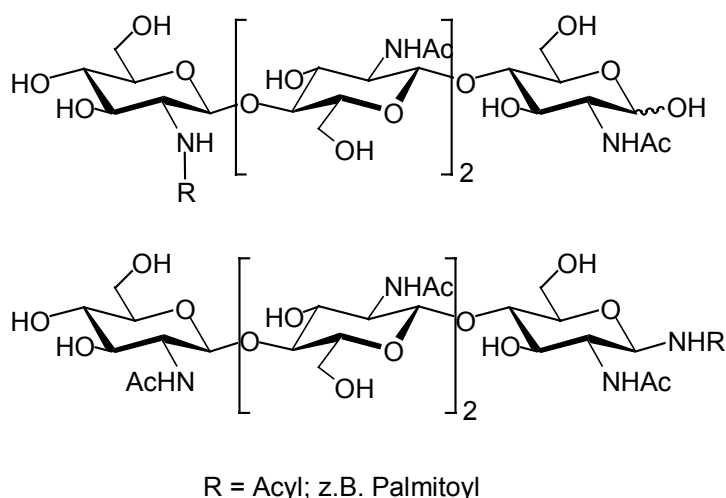


Abb. 2.12: NOD-Strukturen und Derivate.

3. Chemo-enzymatische Synthese des Lec14-*N*-Glycans

Der Syntheseweg des Lec14-*N*-Glycans wurde so ausgelegt, dass nach der chemischen Synthese zwei Galactosereste enzymatisch^[96] auf das freie Nonasaccharid übertragen werden können; dies lässt die Möglichkeit offen, das *N*-Glycan später mit Sialylresten zu versehen.

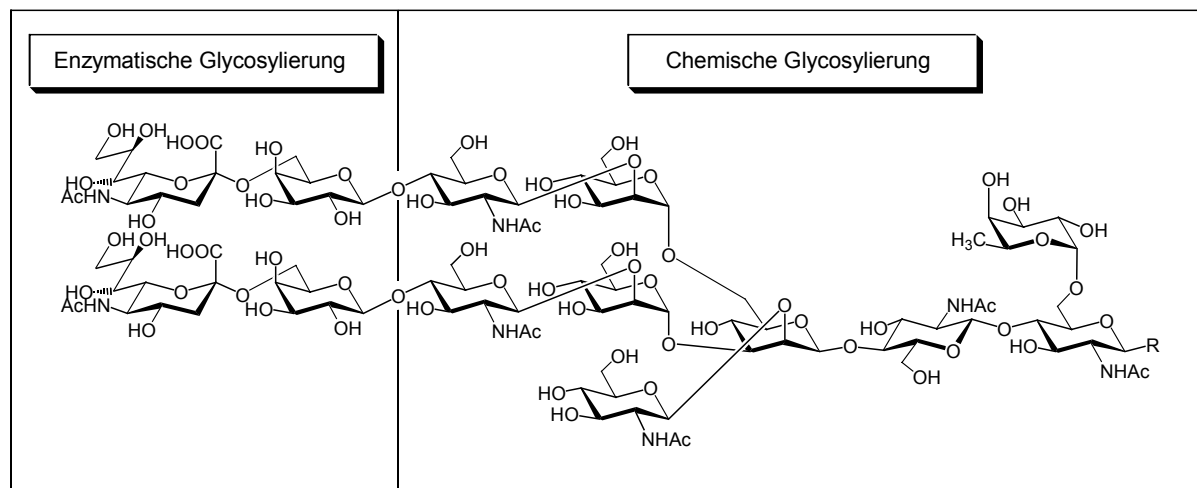


Abb. 3.1: Chemoenzymatischer Aufbau des Lec14-*N*-Glycans.

3.1 Chemische Synthese des Lec14-*N*-Glycans

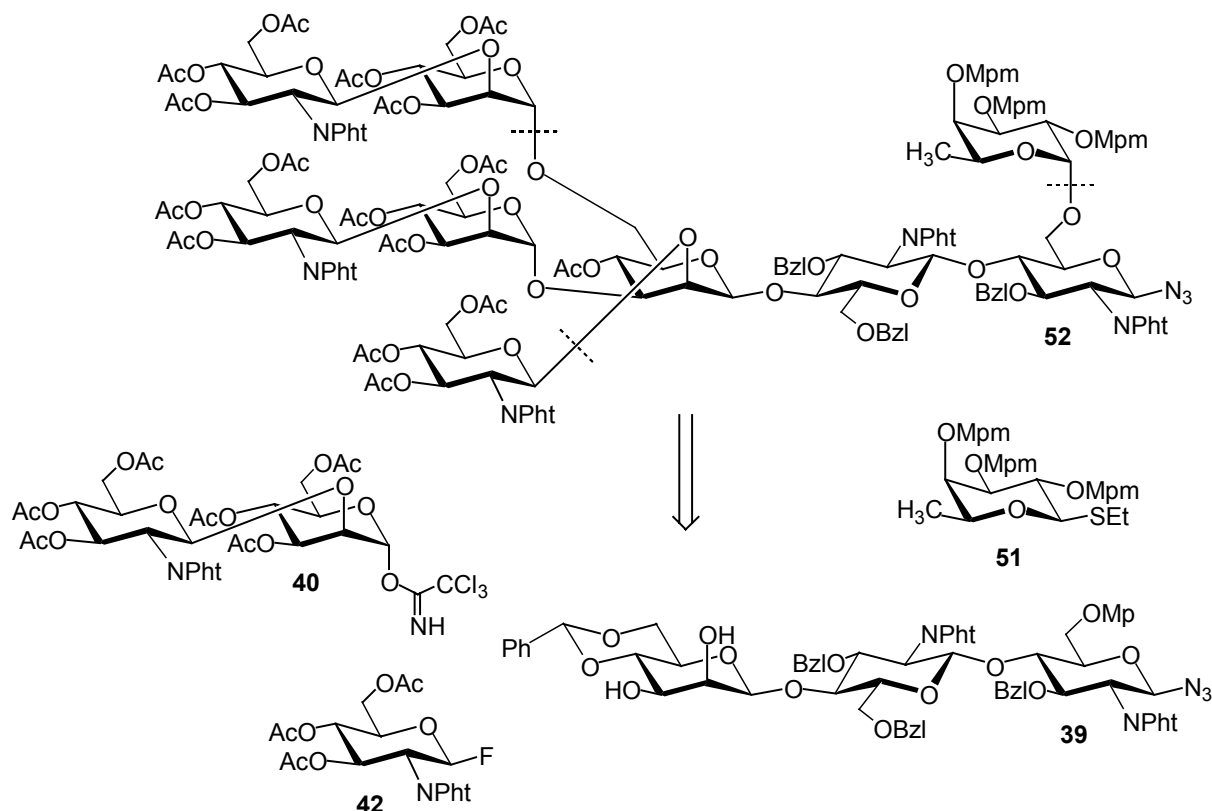


Abb. 3.2: Retrosynthetische Betrachtung des Lec14 Nonasaccharids 52.

Zur Syntheseplanung wurde das geschützte Nonasaccharid **52** zunächst in das Disaccharid **40**, das Ethylthiofucosid **51** und das Core-Trisaccharid **39** unterteilt. Diese Bausteine wurden bereits erfolgreich bei *N*-Glycansynthesen angewandt.^[24,97,98]

Die β -1,2-Verknüpfung von *N*-Acetylglucosamin mit dem β -Mannosid des Core-Trisaccharids sollte mit dem in vorausgegangenen Studien^[97] bewährten Donor **42** erfolgen.

3.1.1 Synthese eines für 1,6-Fucosylierung funktionalisierten Core-Trisaccharids

Für die Darstellung des Core-Trisaccharids **39** wurde das *p*-methoxyphenylgeschützte Azid **16** verwendet. Die *p*-Methoxyphenylgruppe erlaubt im späteren Verlauf der Synthese die regioselektive Einführung des Thiofucosids **51**. Die Azidfunktion ermöglicht als maskierte Aminfunktion nach der Entschützung des Nonasaccharids **52** die Anbindung eines Spacers oder einer Aminosäure.

Da sich Azide unter Mitsunobu-Bedingungen (Verwendung von Triphenylphosphin) zersetzen, konnte *p*-Methoxyphenol als Schutzgruppe in der 6-Position des Monosaccharids **1** nicht mit dieser ansonsten weit verbreiteten Reaktion regioselektiv eingeführt werden.

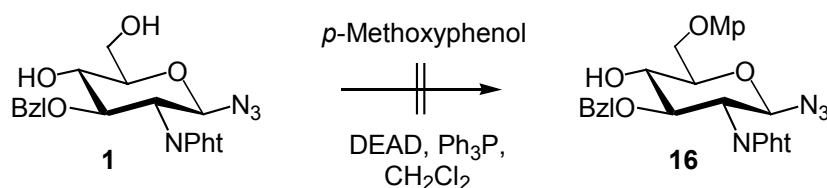


Abb. 3.3: Mitsunobu-Bedingungen sind nicht mit Aziden vereinbar.

Eine Synthese des Azids **16** wurde schon von *J. Seifert*^[98] beschrieben, wobei für die Einführung der *p*-Methoxyphenylschutzgruppe aus oben genannten Gründen der Umweg über das Thioglucosid **2** gewählt wurde.

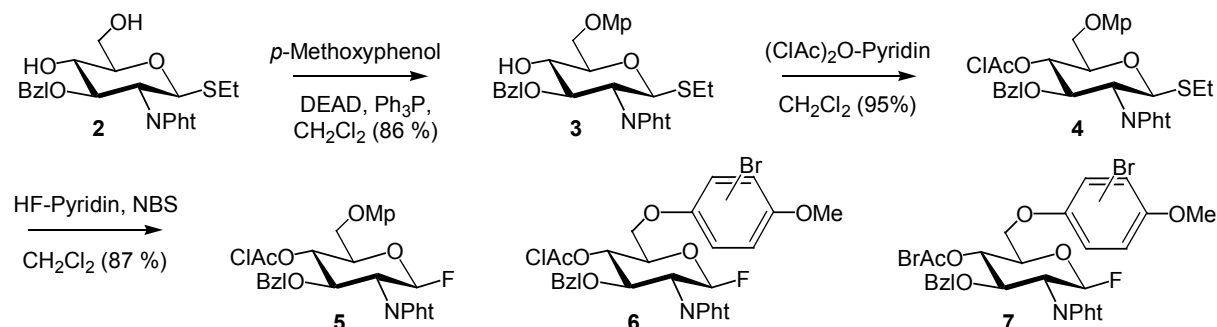


Abb. 3.4: Halogenierung der elektronenreichen OMp-Schutzgruppe als unerwünschte Nebenreaktion.^[98]

Bei der Umwandlung des Thioglucosids **4** über das Fluorid **5** in das betreffende Azid wurde jedoch der elektronenreiche *p*-Methoxyphenolring durch das verwendete *N*-Bromsuccinimid halogeniert, wie auch vor kurzem von anderen Autoren beobachtet.^[99] Man erhielt dadurch

ein Gemisch von unhalogenierten und verschiedenen halogenierten Verbindungen. Diese waren säulenchromatographisch nicht mehr trennbar.^[98]

Deswegen wurde von *J. Seifert* ein neuer, aber längerer Syntheseweg erarbeitet, bei dem das Diol **2** zunächst wieder mit Acetatgruppen geschützt und anschließend unter Verwendung von NBS fluoriert wird. Danach werden die Acetatgruppen wieder entfernt, die *p*-Methoxyphenylschutzgruppe unter Mitsunobu-Bedingungen eingeführt, die 4-Position mit einem Chloracetylrest geschützt, das Fluorid **12** mit Trimethylsilylazid in das Azid **13** überführt und schließlich die Chloracetylschutzgruppe wieder entfernt, um Verbindung **16** zu erhalten.

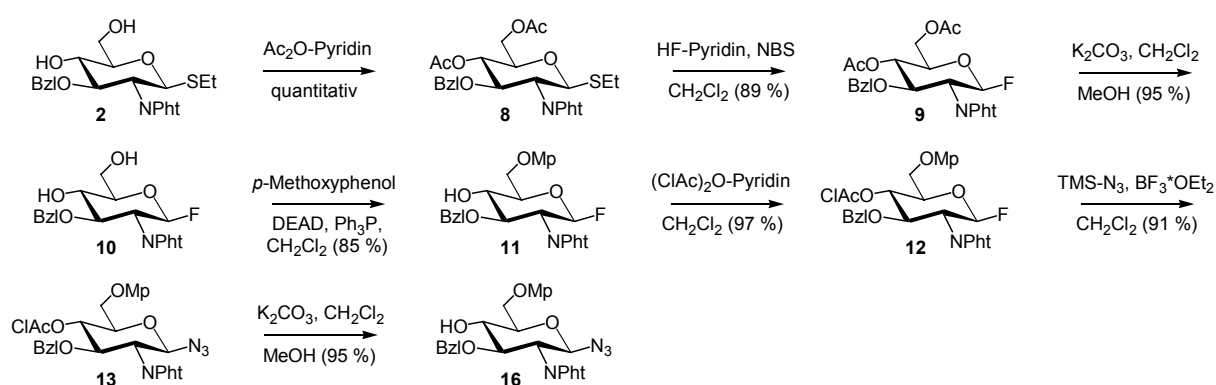


Abb. 3.5: Darstellung des Omp-geschützten Azids nach *J. Seifert*.^[98]

Da der Azidbaustein **16** mit der Omp-Schutzgruppe eine orthogonal funktionalisierte Ausgangsverbindung für verschiedenste Synthesen darstellt, sollte ein schnellerer und einfacherer Zugang gefunden werden.

Bei eigenen Versuchen^[97] zur Überführung von Thioglucosiden in die entsprechenden Fluoride mit *N*-Chlorsuccinimid wurde beobachtet, dass bei der Umsetzung von kleinen Mengen bei kurzen Reaktionszeiten keine Halogenierung am aktivierten Aromaten nachzuweisen war. Bei der Umsetzung größerer Substanzmengen, die eine längere Reaktionszeit erforderten, wurde jedoch ein Gemisch aus der gewünschten Verbindung und unerwünschten monohalogenierten Nebenprodukten erhalten.

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche unternommen, die primäre OH-Funktion an Position 6 des Diols **1** selektiv mit einer Abgangsgruppe zu versehen, die eine direkte Verknüpfung mit *p*-Methoxyphenol ermöglicht.

Die zunächst verwendete Tosylgruppe konnte erfolgreich in guten Ausbeuten selektiv an Position 6 des Diols **1** eingeführt werden.

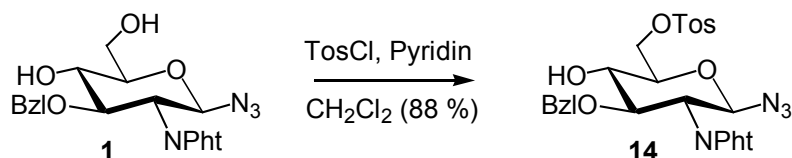


Abb. 3.6: Regioselektive Einführung der Tosylgruppe.

Die nachfolgenden Reaktionen mit *p*-Methoxyphenol und Base (Natriumhydrid), mit *p*-Methoxyphenolsalzen (u.a. Cäsiumsalz) bzw. Natrium-*p*-methoxyphenolat unter Phasentransferbedingungen konnten die Tosylatgruppe jedoch nicht angreifen, sie war auch bei höherer Temperatur (60°C) gegenüber anderen Nucleophilen stabil.

Erfolg brachte erst die Verwendung der Triflylgruppe, die bei –80°C in Dichlormethan mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Lutidin als sterisch gehinderter Base unter sehr milden Bedingungen regioselektiv an Position 6 eingeführt wurde. Es erwies sich als vorteilhaft, das *p*-Methoxyphenol in wässriger 2N Natronlauge in das Phenolat zu überführen und dieses mittels Phasentransferkatalysator mit dem Triflat zur Reaktion zu bringen, was bei dieser Eintopfreaktion in einer Ausbeute von 86 % gelang.

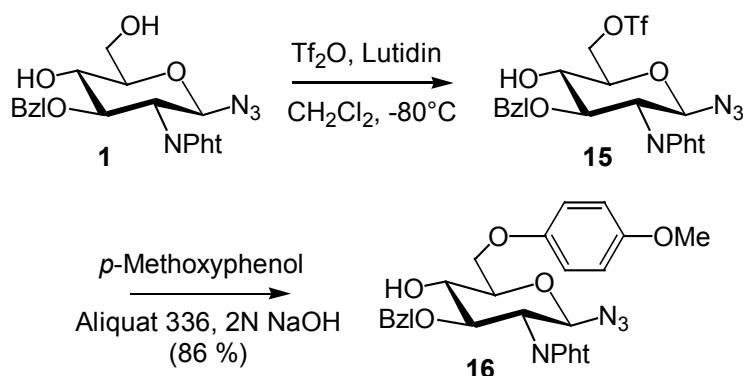


Abb. 3.7: Direkte, regioselektive Einführung der OMP-Schutzgruppe in Gegenwart einer Azidfunktion.

Nach *J. Seifert* werden sieben Stufen mit einer Gesamtausbeute von 60 % benötigt, um von Verbindung **2** zu dem gewünschten Glycosylakzeptor **16** zu gelangen (vgl. **Abb. 3.5**). Mit dem neuen Verfahren ist Verbindung **16** jedoch aus der Azidoverbindung **1** in einer Stufe mit 86 % Ausbeute zugänglich (vgl. **Abb. 3.7**).

3.1.1.1 Synthese eines Chitobiosylazids

Die von *C. Unverzagt* etablierte Synthese von Chitobiosylazid verwendet das Fluorid **20** als Glycosyldonor unter Aktivierung durch Bortrifluoridetherat.^[96,98,100] Verbindung **20** konnte aus dem Benzylidenacetal **17** in 3 Stufen rasch und in guten Ausbeuten erhalten werden.

Dazu erfolgte zunächst eine reduktive Ringöffnung des Benzylidenacetals, wobei in der vorliegenden Arbeit nicht das auf *P. Garegg*^[101] zurückgehende System aus

3. Chemo-enzymatische Synthese des Lec14-*N*-Glycans

Natriumcyanoborhydrid und HCl-Etherat, sondern das wesentlich ungiftigere und leichter handhabbare System aus Triethylsilan und Trifluoressigsäure eingesetzt wurde.^[102] Anstelle von Trifluoressigsäure kann auch Trifluormethansulfonsäure oder Bortrifluoridetherat verwendet werden.^[103,104] Die so erhaltene Verbindung **18** wurde an der Position 4 mit einer Chloracetylschutzgruppe versehen und anschließend mit HF-Pyridin und *N*-Bromsuccinimid zu dem kristallinen Fluorid **20** umgesetzt.

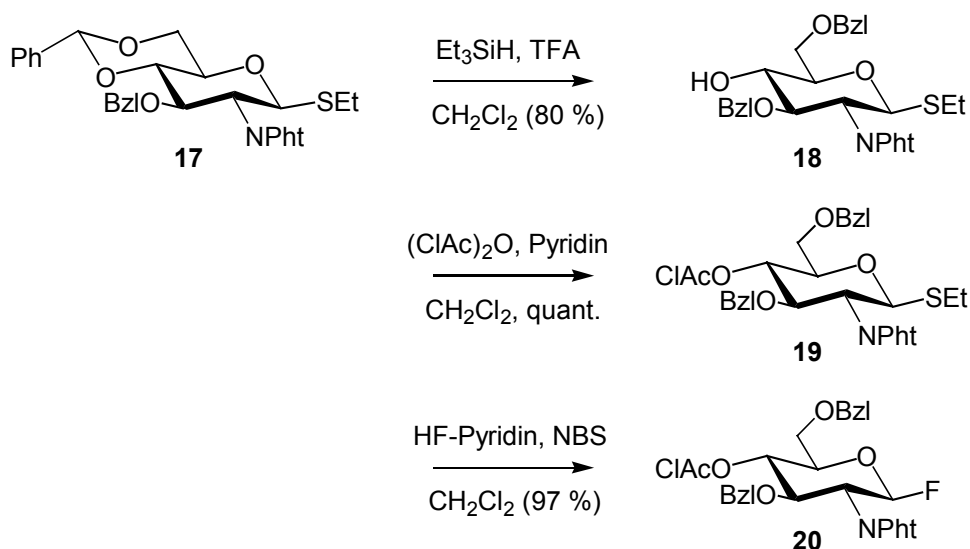


Abb. 3.8: Reduktive Acetalöffnung und Fluorierung des Thioglucosids **17**.

Mit den Bausteinen **20** und **16** konnte in zwei Stufen das Chitobiosylazid **22** hergestellt werden.^[98]

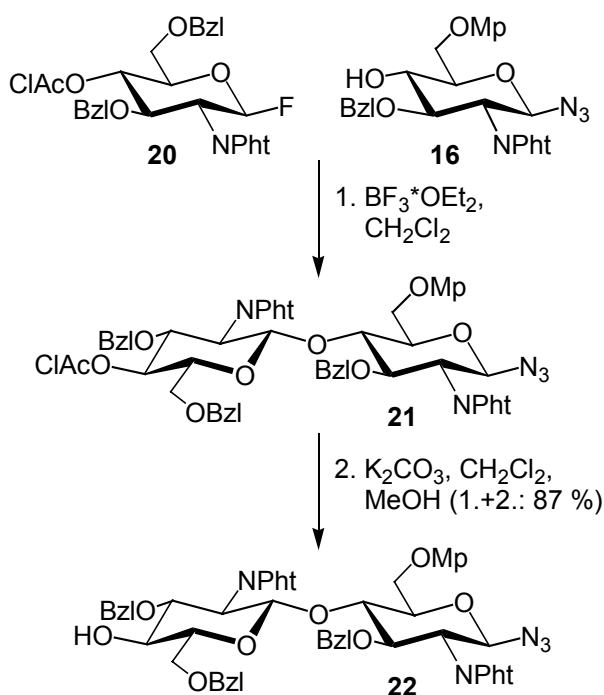


Abb. 3.9: Darstellung von OMP-geschütztem Chitobiosylazid.

Die Glycosylierung an der freien 4-OH-Funktion des Akzeptors erfolgte unter Verwendung von Bortrifluoridetherat in Dichlormethan. Die chloracetylierte Verbindung **21** wurde ohne weitere Reinigung in Dichlormethan / Methanol mit Kaliumcarbonat zum Chitobiosylazid **22** entschützt. Wichtig bei dieser ansonsten sehr rasch und problemlos verlaufenden Reaktion war es, das Kaliumcarbonat fein zu pulvern, da das technische, grobkörnige Kaliumcarbonat sonst nur extrem langsam reagierte.

3.1.1.2 Untersuchungen zur direkten β -Mannosylierung

Der Chitobiosylazidbaustein **22** stellt einen Glycosylakzeptor dar, der formal nur noch mit einem Mannosyldonor β -selektiv glycosyliert werden müsste, um das gewünschte Core-Trisaccharid zu erhalten. β -Mannoside sind in der Natur sehr verbreitet.^[105] So finden sie sich u.a. in dem Core-Pentasaccharid von *N*-Glycanen, in Glycosphingolipiden und in Hüllenspolysacchariden.

Gerade die β -Mannosylierung stellt ein lange bestehendes Problem der Kohlenhydratchemie dar. Mannosyldonoren ergeben bei Glycosylierungen fast ausschließlich α -verknüpfte Verbindungen. Dies ist zum einen auf den anomeren Effekt zurückzuführen, der generell bei Glycosylierungen eine α -Verknüpfung begünstigt. Zum anderen entfällt aufgrund der axialstehenden Hydroxylfunktion an Position 2 der Mannose die Möglichkeit, durch die Nachbargruppenbeteiligung eine β -Verknüpfung zu erzwingen.

Der von *H. Kunz*^[106] eingeführte Weg der β -selektiven Glycosylierung eines Akzeptors mit einem Glucosederivat mit anschließender intramolekularer Inversion der 2-OH-Funktion zur Mannose stellt eine ausgezeichnete Möglichkeit dar, das Core-Trisaccharid mit der gewünschten β -verknüpften Mannose zu erhalten. Diese Inversionssequenz bringt jedoch den Nachteil von vier Stufen mit einer Ausbeute von ca. 60 % mit sich.^[96,98]

Im Gegensatz zu einer intramolekularen Inversion kann durch die Verwendung von Triflaten an Position 2 eine intermolekulare Inversion erreicht werden. Die Triflate werden durch einen S_N2 -Angriff substituiert, als Nucleophil kann z.B. *n*-Bu₄NOAc^[107] verwendet werden, was zu acetatgeschützten Mannosederivaten führt. Hierbei ist die Inversion aber nicht in allen Fällen vollständig, so dass ein Gemisch aus Mannopyranosyl- und Glucopyranosylverbindung auftreten kann.

Teilweise geringe Ausbeuten, aber vor allem den Nachteil eines möglichen α : β -Gemischs birgt die Inversion eines Glucopyranosids durch Entfernen der Schutzgruppe an Kohlenstoffatom 2, Oxidation und nachfolgende Reduktion der Verbindung.^[108]

Eine verwandte Reaktion ist die Verwendung von 2-Oxo-glycosylhalogeniden.^[109] Dabei reagieren α -Bromide über eine S_N2 -Reaktion unter Königs-Knorr-Bedingungen zu β -verknüpften Produkten. Die Glycosylierungsreaktion wie auch die nachfolgende Reduktion der Carbonylgruppe sind sehr abhängig von den sterischen Gegebenheiten und elektronischen Eigenschaften des betreffenden Ulosebausteins.

Eine weitere Möglichkeit, β -selektive Mannosylierung zu erzielen, ist die intramolekulare Aglycon-Delivery.^[110,111,112,113] Hierbei wird der Glycosylakzeptor über diverse Struktureinheiten kovalent mit der 2-OH-Gruppe eines geeigneten Mannosederivats verknüpft und dadurch so fixiert, dass bei der nachfolgenden Glycosylierung die OH-Funktion des Akzeptors durch das Mannosylkation nur noch β -selektiv angegriffen werden kann. Verwendete Struktureinheiten sind z.B. Dimethylacetale,^[110] Dimethyl-Dialkoxysilane^[111] bzw. *p*-Methoxybenzylidenacetale.^[112] Die Nachteile dieser Methode liegen aber wiederum bei z.T. geringen Ausbeuten und langwierigen Synthesesequenzen, um die benötigten Struktureinheiten regio- und stereoselektiv einzuführen und nach der erfolgten Glycosylierung wieder zu entfernen.

Auch enzymatische Synthesen^[114] wurden eingesetzt, um β -mannosidische Verknüpfungen zu erhalten. Dieser Ansatz birgt allerdings noch einige Probleme bezüglich der Verfügbarkeit der Enzyme, der Ausbeuten und vor allem geeigneter Substrate. So ist gerade die im Core-Trisaccharid benötigte Man- β -(1,4)-GlcNAc Verknüpfung nicht leicht zu erreichen und ergibt nur geringe Ausbeuten.^[115]

Aufgrund der Einschränkungen und Nachteile der oben angesprochenen Möglichkeiten zur β -selektiven Mannosylierung werden nach wie vor zahlreiche Versuche unternommen, durch geeignete Mannosendonoren eine direkte und β -selektive Glycosylierung zu erzielen. So haben *Crich* und *Sun* direkte β -Mannosylierungen mit Sulfoxiden und Thioglycosiden unter Aktivierung mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid bzw. Phenylsulfonyltrifluormethansulfonat durchgeführt. Die besten Ergebnisse wurden bei Akzeptoren mit primären Alkoholgruppen erzielt, bei Glycosylierungen selbst an der primären 6-OH-Gruppe von *N*-Acetylglucosaminverbindungen konnten jedoch nur mäßige bis schlechte Ausbeuten erhalten werden.^[116] Bei spektroskopischen Untersuchungen wurde das α -Mannosyltriflat als reaktives Intermediat identifiziert. Dabei gaben Donoren, die keine 4,6-*O*-Benzylidenschutzgruppe aufwiesen, wesentlich schlechtere α : β -Verhältnisse, weshalb die Benzylidenschutzgruppe für β -selektive Mannosylierungen essentiell erscheint. Diese Beobachtung wird so interpretiert, dass die Benzylidenschutzgruppe vermutlich aufgrund ihres sterischen Einflusses auf das Molekül das Triflat stabilisiert und damit deaktiviert

(„torsionally disarmed“) und das α -Triflat dadurch bevorzugt über einen S_N2 -artigen Angriff substituiert wird, der zu β -Produkten führt. Dagegen überwiegt z.B. bei der reaktiven („armed“) Tetrabenzylmannose die S_N1 -Reaktion, so dass hier die β -Selektivität bei der Glycosylierung verloren geht.

Sehr interessant hierbei ist die Beobachtung von *R. Schmidt*,^[117] dass mit α -Trichloracetimidaten als Mannosyldonoren praktisch die gleichen $\alpha:\beta$ Produktverhältnisse erhalten werden wie bei der Verwendung der oben erwähnten Sulfoxid- und Thioglycosidmethode. Dies legt den Schluss nahe, dass die Aktivierung von Trichloracetimidatdonoren und Sulfoxid-/Thioglycosiddonoren zu gemeinsamen Intermediaten führt, die β -Produktbildung begünstigen. Die Tatsache, dass auch mit β -Trichloracetimidaten die gleichen guten $\alpha:\beta$ -Verhältnisse erhalten werden, ist jedoch nicht mit dem bei Sulfoxiden und Thioglycosiden postulierten Mechanismus in Einklang zu bringen, bei dem die α -Triflatzwischenstufe als entscheidend für die β -Produktbildung angesehen wird. Vielmehr geht *R. Schmidt* davon aus, dass vor allem die 4,6-*O*-Benzylidenschutzgruppe für das gute $\alpha:\beta$ -Verhältnis verantwortlich ist und den Pyranosylring in eine der twist-boat-Form ähnliche Konformation zwingt. Daher sollte dieses Intermediat aus sterischen Gründen bevorzugt von der β -Seite her angegriffen werden, wobei das Endprodukt sich wieder zu einem 4C_1 -Konformer entspannt. Dieser Vorschlag könnte eine Erklärung für alle bisherigen Ergebnisse mit verschiedenen Mannopyranosyldonoren geben.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die direkte Mannosylierung mit geeigneten Donoren weiter zu untersuchen und zu optimieren, um β -selektive Mannosylierungen speziell mit den verwendeten Chitobiosylaziden **22** bzw. **30** zu erzielen. Damit könnte die Synthese der entsprechenden Core-Trisaccharide verkürzt und der durch die Inversion verursachte Substanzverlust verringert werden.

Dazu wurden 1-Phenylthiomannoside mit der vielversprechenden, β -dirigierenden 4,6-*O*-Benzylidenschutzgruppe^[116] hergestellt, und die Schutzgruppen in Position 2 und 3 variiert. Bei der Wahl der Schutzgruppen musste auf Verträglichkeit bzw. Orthogonalität bezüglich der vorhandenen Schutzgruppen geachtet werden. Die 2,3-Diolverbindung **23**, die als Ausgangssubstanz für alle weiteren 1-Phenylthiomannosidderivate dient, ist in einer vierstufigen Synthese aus Mannose leicht zugänglich.

Zunächst wurde die Trimethylsilylschutzgruppe für die Positionen 2 und 3 des 1-Phenylthiomannosids **23** ausgewählt, da nach sterisch wenig anspruchsvollen Schutzgruppen gesucht wurde. Dazu wurde das Diol **23** in Dichlormethan und Pyridin gelöst

und mit 4-Dimethylaminopyridin und Trimethylsilylchlorid in das vollständig geschützte Mannosid **24** überführt.^[118]

Das cyclische 2,3-Carbonat **25** interessierte wegen seiner aufgrund der sterischen Spannung von den anderen Mannosiden abweichenden Konformation und wurde aus dem Diol **23** anstatt mit Phosgen^[116] mit Carbodiimidazol in Dichlormethan hergestellt.^[118]

Da Benzylschutzgruppen in Position 2 und 3 von 4,6-*O*-Benzyliden-Thiomannosiden schon erfolgreich bei β -Mannosylierungen verwendet wurden,^[116,117] aber zur Darstellung von *N*-Glycanen an dieser Stelle nicht geeignet sind, wurde das Diol **23** mit *p*-Methoxybenzylchlorid und Natriumhydrid in DMF zu Verbindung **26** mit *p*-Methoxybenzylschutzgruppen (OMpm) in Position 2 und 3 umgesetzt.

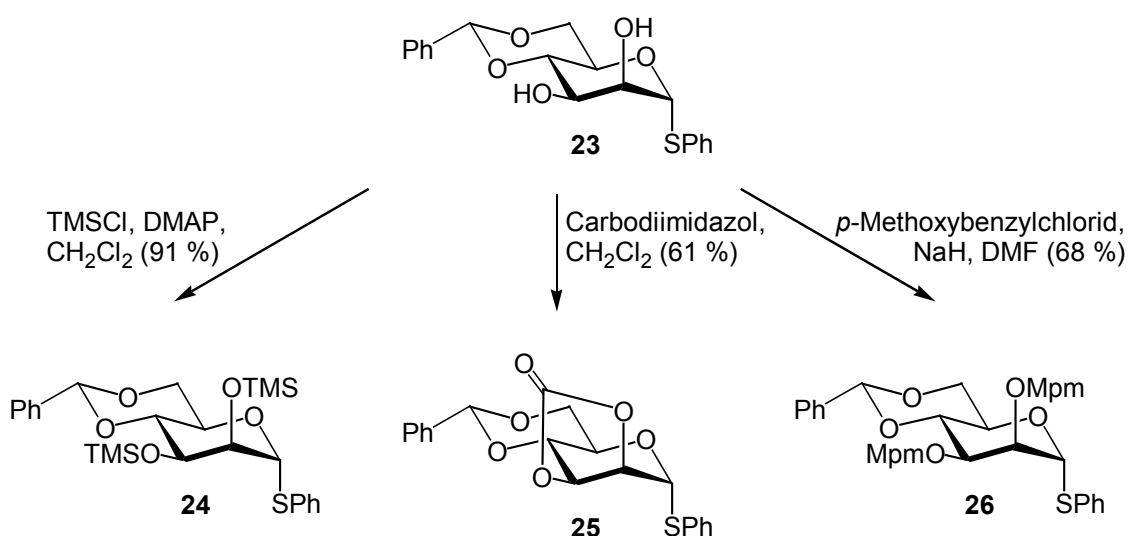


Abb. 3.10: Darstellung verschiedener Mannosyldonoren.

Zur Aktivierung der oben genannten Donoren wurde das schon erfolgreich in Glycosylierungen^[116,119] eingesetzte Phenylsulfonyltrifluormethansulfonat verwendet. Dieses lässt sich *in situ* sehr einfach aus Phenylsulfonylchlorid und Silbertriflat herstellen. Phenylsulfonylchlorid ist über die Umsetzung von Phenylthioacetat mit Sulfurylchlorid^[120] sehr einfach zugänglich. Eine typische Glycosylierungsreaktion mit Aktivierung durch Phenylsulfonyltriflat- wurde wie folgt durchgeführt: Silbertriflat wurde in einem abgedunkelten Kolben kurz im Hochvakuum getrocknet, unter Argon mit Dichlormethan versetzt und auf -90°C gekühlt. Anschließend wurde in Dichlormethan gelöstes Phenylsulfonylchlorid zugegeben. Der betreffende Mannosyldonor und Di-*tert*-butylmethylpyridin als sterisch gehinderte Base wurden in Dichlormethan gelöst zugegeben, unmittelbar danach erfolgte Zugabe des in Dichlormethan gelösten Akzeptors. Nach Reaktionsende wurde mit 2N Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über

Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Um die Reaktion an einem einfachen System zu testen, wurde zunächst jeder der drei Donoren mit Cyclohexanol umgesetzt.

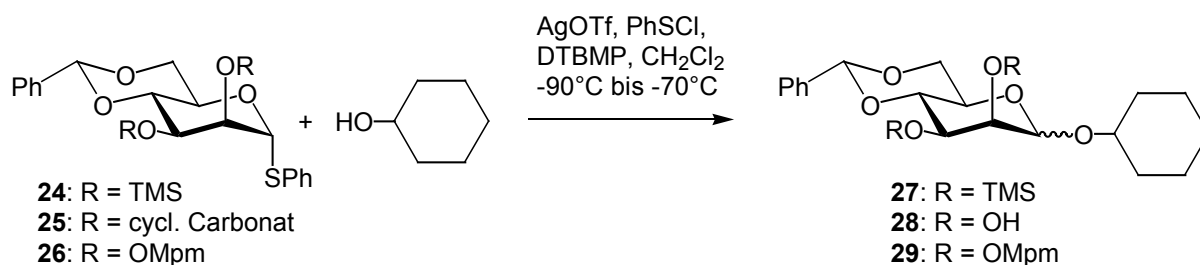


Abb. 3.11: Mannosylierungen mit Cyclohexanol.

Dabei stellte sich heraus, dass die trimethylsilylgeschützten Verbindungen relativ empfindlich sind und leicht eine oder beide Trimethylsilylschutzgruppen verlieren. Jedoch konnte mit diesem Donor und Cyclohexanol als Akzeptor nach säulenchromatographischer Reinigung reines β -verknüpftes Produkt **27** mit einer C-H-Kopplungskonstante von 156.8 Hz am anomeren Kohlenstoff in einer Ausbeute von 64 % erhalten werden.

Das cyclische 2,3-Carbonat **25** ergab bei der Glycosylierung mit dem Testsystem Cyclohexanol wie erwartet^[116] in einer Ausbeute von 68 % ausschließlich α -Produkt mit einer C-H-Kopplungskonstante von 168.3 Hz (gemessen bei der Diolverbindung **28** nach Entschützung der Carbonatgruppe). Deswegen wurde Verbindung **25** nicht weiter als Donor eingesetzt.

Die OMpm-geschützte Verbindung **26** stellte sich für diese Umsetzung als der am besten geeignete Donor heraus. Die Glycosylierung mit Cyclohexanol erfolgte direkt bei Zugabe des Aktivators trotz der tiefen Temperatur von -90°C in einer Ausbeute von 77 % zu rein β -verknüpftem Produkt **29** mit einer C-H-Kopplungskonstante von 156.0 Hz.

Es wurden mit den Donoren **24** und **26** Glycosylierungen an Chitobiosylazid als Akzeptor vorgenommen. Dabei wurde als Modellverbindung das leichter zugängliche, in Position 6 benzylgeschützte Chitobiosylazid **30** anstelle der in der Lec14-Synthese verwendeten Verbindung **22** verwendet.

Mit dem trimethylsilylgeschützten Donor **24** ergaben sich hierbei schlecht trennbare Gemische mit an der 4-OH-Funktion trimethylsilyliertem Chitobiosylazid **31** und nicht umgesetztem Chitobiosylazid **30** als Hauptprodukt; knapp 20 Gew.-% des Produktgemisches bestanden aus Trisaccharid **32**, das mit trimethylsilyliertem Chitobiosylazid verunreinigt war. Da auch durch Variation der Verhältnisse von Donor, Akzeptor, Base und Aktivator und der Reaktionstemperatur keine zufriedenstellenden Ausbeuten in ausreichender Reinheit erhalten

werden konnten, wurde von weiteren Versuchen mit diesem Donor-Akzeptor-System abgesehen.

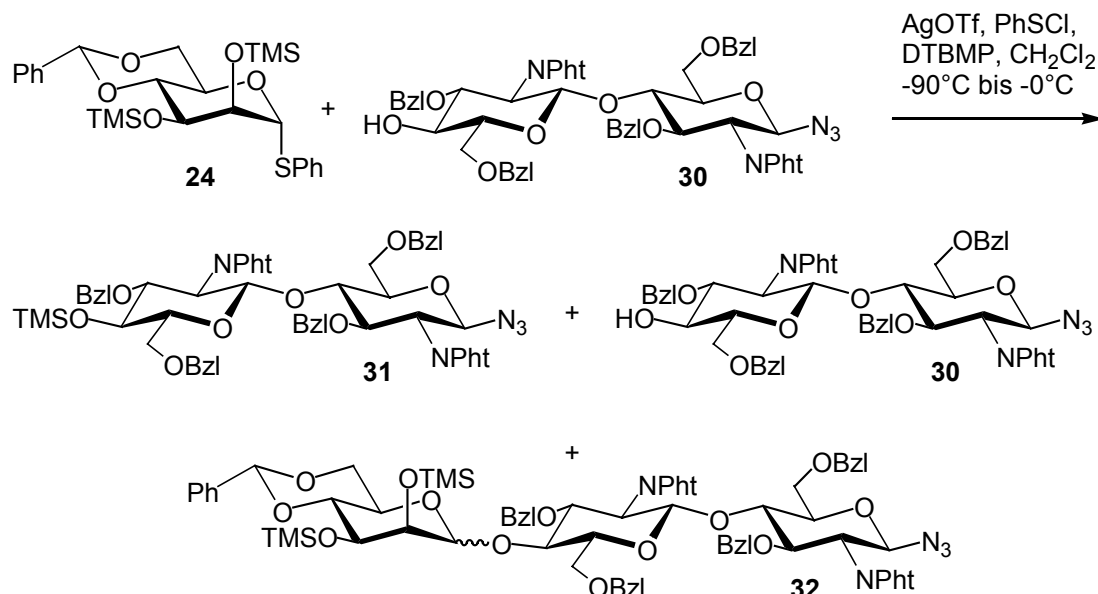


Abb. 3.12: Mannosylierung am Core-Trisaccharid mit 2,3-Di-TMS-geschütztem Donor **24**.

Der OMpm-geschützte Donor **26** bietet den Vorteil, dass die Schutzgruppen nicht, wie bei Verwendung von Trimethylsilylschutzgruppen, während der Reaktion auf den Akzeptor übertragen werden können. Es wurden aber auch hier trotz Variation der Verhältnisse von Donor, Akzeptor, Base, Aktivator und Reaktionstemperatur keine besseren Ergebnisse als bei der Verwendung des Donors **24** erzielt. Die Ausbeute war vermutlich aufgrund des erhöhten sterischen Anspruchs der OMpm-Schutzgruppen geringer. Auch die wesentlich längere Reaktionszeit sowie die notwendige höhere Reaktionstemperatur (erste sichtbare Umsetzung ab -45°C) deuteten auf eine sterische Hinderung hin. Das Produktgemisch aus 1-1-verknüpftem Dimannosid **33**, nicht umgesetztem Chitobiosylazid **30**, dem Trisaccharid **34** und nicht identifizierten Nebenprodukten war wiederum schlecht trennbar. Somit erwies sich auch dieses System für die Darstellung des gewünschten Core-Trisaccharids unter Verwendung des Chitobiosylazids **30** als präparativ unbrauchbar.

Die Donoren **24** und **26**, die beim Testsystem mit Cyclohexanol β -selektive Glycosylierungen erzielten, waren für das unreaktive^[105] Akzeptormolekül **30** nicht direkt verwendbar. Da die Umsetzungen mit dem sterisch wenig anspruchsvollen Cyclohexanol aber sehr vielversprechend sind, könnte ein sterisch weniger anspruchsvolles System zum Ziel führen.

Dabei sind die Möglichkeiten, den Donor weiter zu variieren, relativ gering. Einerseits ist die Anwesenheit der für gute β -Selektivitäten notwendigen 4,6-*O*-Benzylidenschutzgruppe erforderlich. Andererseits müssen die in Position 2 und 3 der Mannose verwendeten

Schutzgruppen mit der modularen *N*-Glycan-Synthesestrategie orthogonal verträglich sein und sollten möglichst klein gewählt werden, um nicht durch sterische Hinderung α -Produkte zu begünstigen.

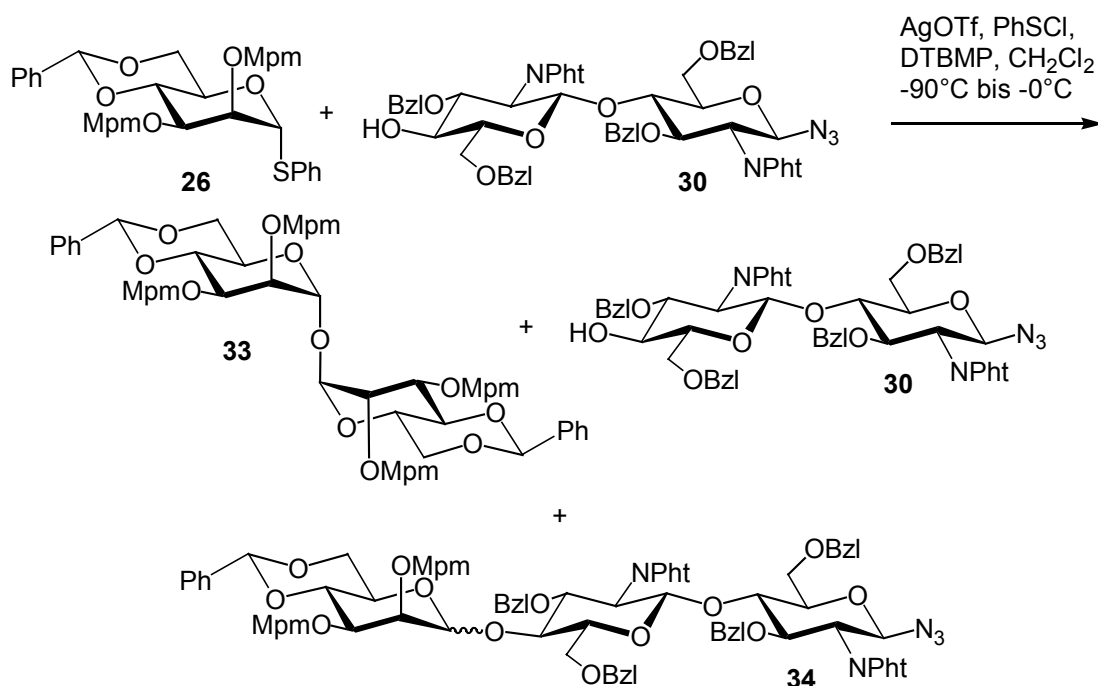
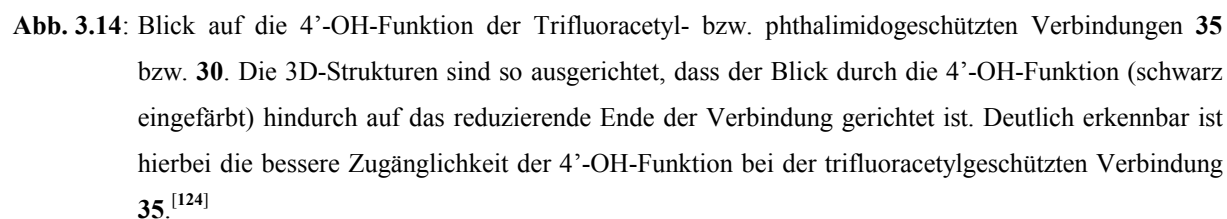


Abb. 3.13: Mannosylierung am Core-Trisaccharid mit 2,3-Di-OMpm-geschütztem Donor 26.

Eine Verbesserung der Reaktion sollte aber z.B. bei der Aktivierung möglich sein. So führen Trichloracetimide^[117] im direkten Vergleich mit der Sulfoxidmethode zu teilweise besseren Ausbeuten und einem vergleichbaren α : β -Verhältnis. Möglicherweise sind die Reaktionstemperaturen von ca. -80°C (Sulfoxidmethode) bzw. -50°C (Imidatmethode) einfach zu gering, um bei sterisch problematischen und relativ unreaktiven Akzeptoren einen guten Umsatz zu erzielen. Gerade in diesem Zusammenhang wäre die Verwendung der *N*-Iodsuccinimid-Trifluormethansulfonsäure-Aktivierung bei β -Mannosylierungen^[121] möglich, da sie bei 0°C abläuft und laut Literatur gute α : β -Verhältnisse liefert. Allerdings kann sie nicht bei elektronenreichen Aromaten wie der OMpm-Schutzgruppe eingesetzt werden, da die Gefahr der Teilhalogenierung am Aromaten besteht und somit ein chromatographisch nicht mehr trennbares Gemisch von Verbindungen entsteht (vgl. Kapitel 3.1.1).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Akzeptor durch die Wahl neuer Schutzgruppen sterisch weniger anspruchsvoll zu gestalten. Dabei sollte an den Benzylschutzgruppen festgehalten werden, da sie im späteren Verlauf der Synthese die Reinigung des basisch entschützten Oligosaccharids über eine RP-Säule ermöglichen. Die Benzylreste sind an dieser Stelle entscheidend für die Abtrennung möglicher Nebenprodukte und damit die Reinheit der



3.1.1.3 Verwendung der intramolekularen Inversion

Da die literaturbekannten Probleme der direkten β -Mannosylierung in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht zufriedenstellend umgangen werden konnten, wurde der auf *H. Kunz*^[106] zurückgehende und von *C. Unverzagt*^[125] und *J. Seifert*^[98] speziell auf das Core-Trisaccharid angewandte Weg der intramolekularen Inversion gewählt. Dazu wurde der Donor **36** unter Aktivierung durch Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester mit dem Chitobiosylazid **22** β -selektiv zu dem Trisaccharid **37** umgesetzt. Dieses wurde ohne weitere Reinigung unter milden Bedingungen mit Kaliumcarbonat in Dichlormethan / Methanol zu Verbindung **38** entschützt, wobei die Phthalimidogruppen nicht angegriffen wurden.

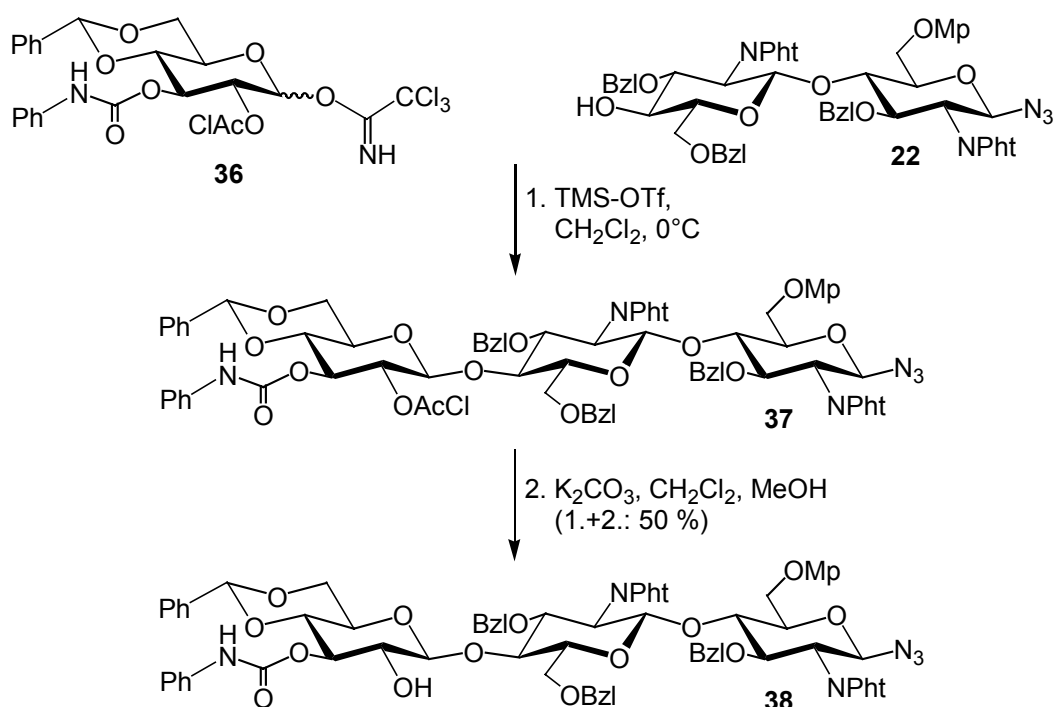


Abb. 3.15: Synthese des β -gluco-konfigurierten Trisaccharids **38** als Vorläufer der intramolekularen Inversion.

Bei der Aktivierung des Trichloracetimidats **36** mit Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester trat jedoch als unerwünschte Nebenreaktion die Silylierung der freien 4'-OH-Funktion des Chitobiosylazidakzeptors **22** auf, der somit für die Glycosylierung nicht mehr zur Verfügung stand. Mit steigender Substanzmenge nahm diese Nebenreaktion stark zu: bei Verwendung von 22.3 g Chitobiosylazid **22** wurden nur 38 % des gewünschten Trisaccharids **38** erhalten, bei Verwendung von 4.6 g Chitobiosylazid **22** als Akzeptor wurde eine Ausbeute von 50 % erzielt. Das entstandene Trimethylsilylchitobiosylazid konnte jedoch nach säulenchromatographischer Abtrennung des gewünschten Trisaccharids **38** aus dem restlichen Reaktionsgemisch durch Behandeln mit *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat in Dichlormethan / Methanol wieder in Chitobiosylazid **22** rückgeführt werden. So wurden von den eingesetzten

22.3 g Chitobiosylazid **22** aus dem Reaktionsgemisch 9.2 g (41 %) Chitobiosylazid **22** rückgewonnen, das wiederum für zwei Reaktionen mit je 4.6 g Chitobiosylazid **22** verwendet wurde, womit sich die Ausbeute nach Berücksichtigung des wiedergewonnenen Chitobiosylazids **22** auf 64 % bei der ersten Reaktion erhöhte und damit im erwarteten Bereich^[96,98] lag.

Das gluco-konfigurierte Core-Trisaccharid **38** wurde in einer vierstufigen Reaktionsfolge nach *H. Kunz*^[106] wie auch bei *C. Unverzagt*^[96] und *J. Seifert*^[98] in das gewünschte manno-konfigurierte Core-Trisaccharid **39** überführt.

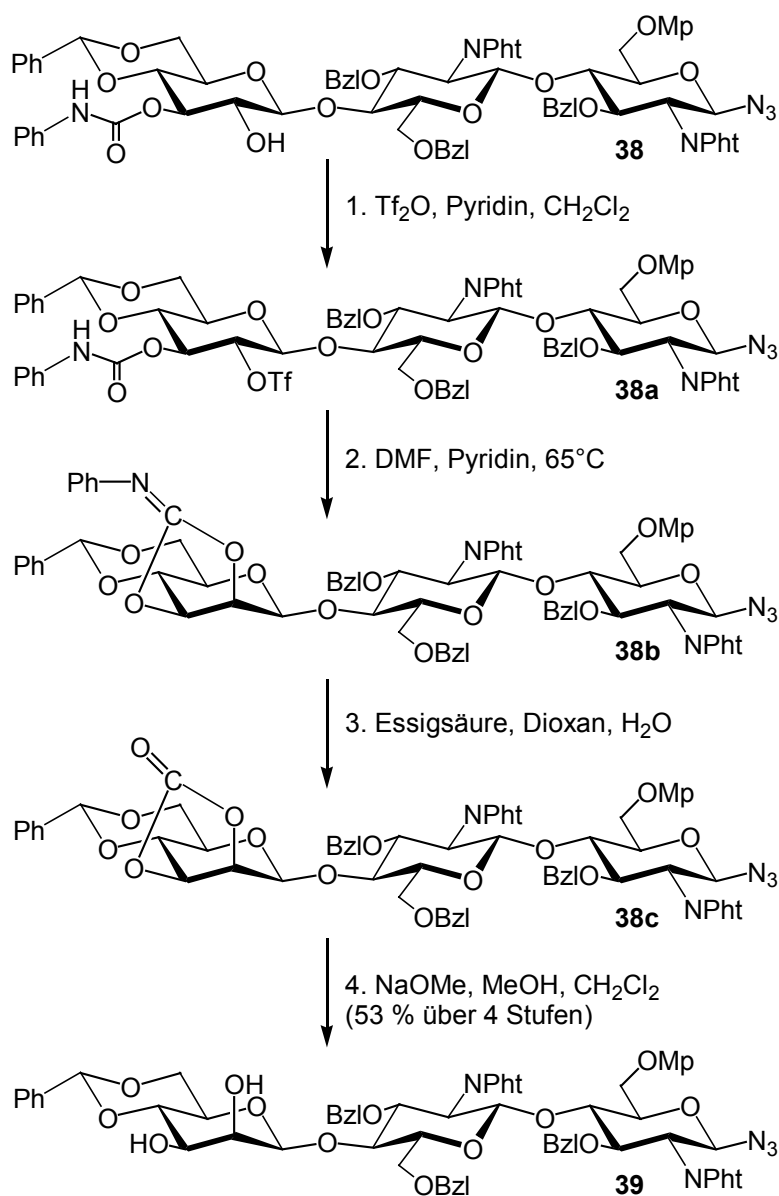


Abb. 3.16: Intramolekulare Inversion zum gewünschten β -manno-konfigurierten Core-Trisaccharid **39**.

Dazu wurde im ersten Schritt die 2''-OH-Gruppe mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Pyridin in Dichlormethan bei -40°C in den Trifluormethansulfonsäureester **38a** überführt. Diese äußerst gute Abgangsgruppe wurde im zweiten Schritt bei 65°C in Dimethylformamid

und Pyridin durch den Carbonylsauerstoff der benachbarten Phenylcarbamoylgruppe intramolekular angegriffen. Die intramolekulare S_N2 -Reaktion bewirkte die Inversion der Glucoverbindung zum manno-Iminocarbonat **38b**. Dieses wurde in einem Gemisch aus Essigsäure, Dioxan und Wasser zum cyclischen β -manno-Carbonat **38c** hydrolysiert. Im letzten Schritt wurde das gewünschte β -manno-Core-Trisaccharid **39** durch basische Spaltung des Carbonats **38c** mit Natriummethanolat erhalten.

3.1.2 Synthese des LEC14-Hexasaccharids

Das erhaltene Core-Trisaccharid **39** ist in *N*-Glycan-Synthesen vielseitig einsetzbar.

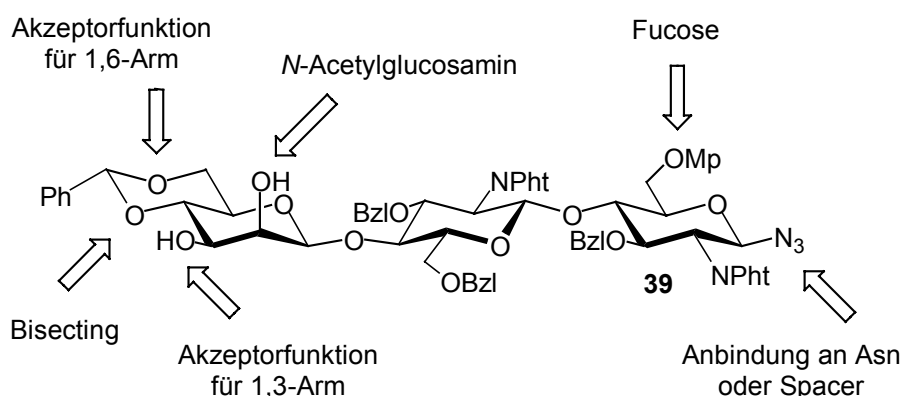


Abb. 3.17: Selektiv funktionalisierbare Positionen am Core-Trisaccharid **39**.

Um zur LEC14-Struktur zu gelangen, wurde zunächst unter Verwendung des Imidats **40**^[96,126,127] der α -1,3-Arm eingeführt. Dabei wurde in absolutem Dichlormethan unter Aktivierung durch 0.25 Äquivalente Bortrifluoridetherat bei -25°C gearbeitet und das Pentasaccharid **41** in 79 % Ausbeute erhalten. Die ungeschützte axiale 2''-OH-Funktion wurde aufgrund ihrer verminderten Reaktivität hierbei nicht angegriffen.

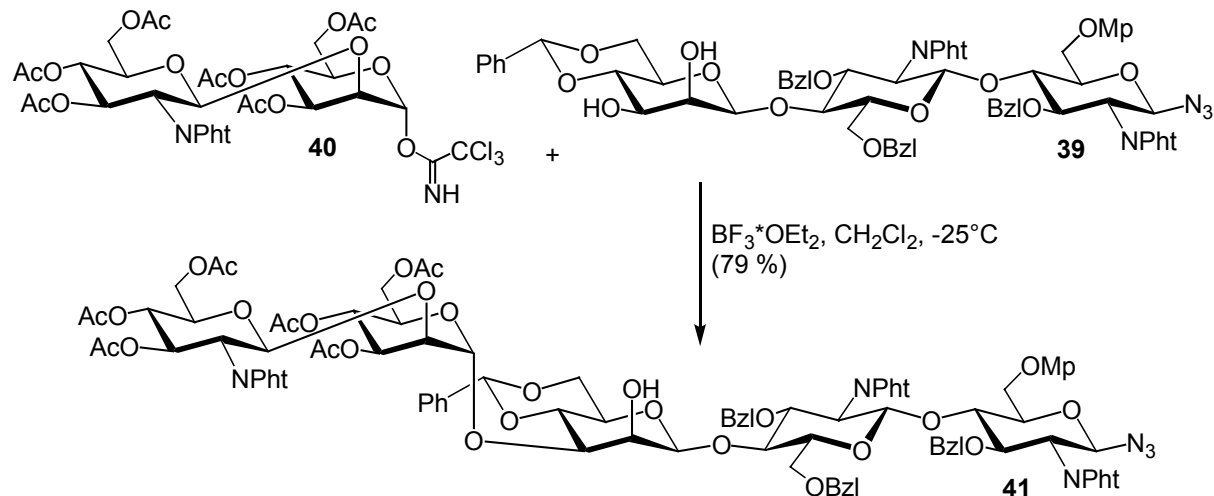


Abb. 3.18: Regioselektive Glycosylierung zum Pentasaccharid **41**.

Abschließend wurde die freie 2''-OH-Funktion des Core-Pentasaccharids **41** glycosyliert. Dazu wurde als Donor das Fluorid **42** gewählt, da dieses bei Glycosylierungen vom bisecting-Typ,^[29] bei denen auch das Problem starker sterischer Hinderung vorliegt, erfolgreich eingesetzt wurde. Für die ersten Glycosylierungsversuche wurden bezüglich Konzentration, Lösungsmittel und Aktivator ebenfalls Bedingungen wie bei Glycosylierungen vom bisecting-Typ gewählt (10 Äquivalente des Donors **42**, Dichlormethan als Lösungsmittel, 1 Äquivalent Bortrifluoridetherat (bezogen auf Akzeptor **41**)). Dabei konnte unterhalb einer Temperatur von -25°C keine Reaktion beobachtet werden.

Nach mehreren Versuchsreihen wurde ein Temperaturoptimum zwischen -20°C und -15°C gefunden. Unter diesen Bedingungen wurde der Akzeptor **41** innerhalb von 15 Minuten verbraucht. Jedoch verschwand der in der Dünnschichtchromatographie sichtbare neugebildete Produktpot bei Temperaturen über -15°C wieder. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte nur der nicht umgesetzte Akzeptor in hohen Ausbeuten gefunden werden.

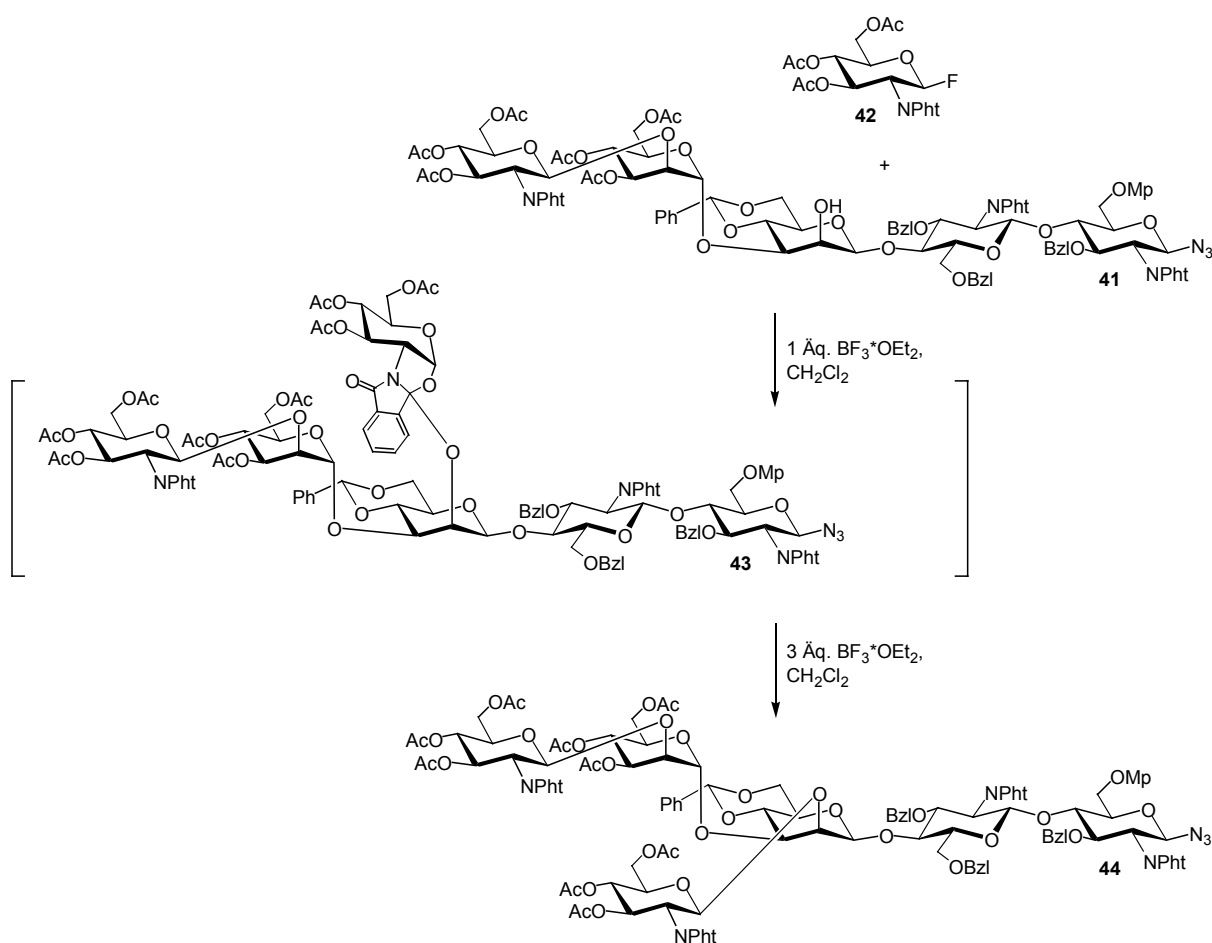


Abb. 3.19: Zunächst postulierter Reaktionsweg des Hexasaccharids **44**.

Labile Glycosylierungsprodukte sind bei der Bildung von Orthoestern bekannt. Diese können sich unter sauren Bedingungen wieder zu Glycosiden umlagern.

Es wurde vermutet, daß die Bildung eines aza-analogen Orthoesters **43** eingetreten war. Eine derartige Verbindung sollte durch weitere Zugabe von Bortrifluoridetherat zum gewünschten Glycosid umgelagert werden können. Das gewünschte Glycosid **44** wurde durch Einsatz von insgesamt 3 Äquivalenten Bortrifluoridetherat erhalten, wenngleich auch in sehr geringen Ausbeuten.

Das vermeintliche Intermediat konnte isoliert und als Triol **45** identifiziert werden. Dieses kommt aber als Zwischenstufe für die Reaktion nicht in Frage, da ansonsten Glycosylierungsprodukte des Core-Pentasaccharids in den Positionen 2'', 4'' und 6'' gefunden werden müssten.

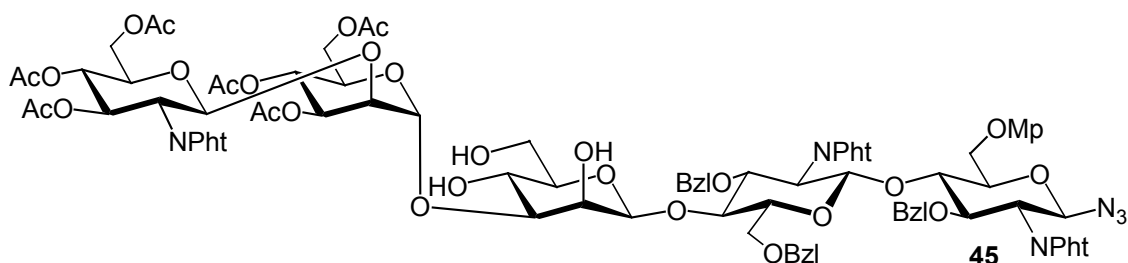


Abb. 3.20: Pentasaccharid **45**.

Eine Erklärung für das Auftreten des Triols **45** bei der dünnschichtchromatographischen Beobachtung zu Beginn dieser Glycosylierungsreaktionen ist, dass die säurelabile Benzylidenschutzgruppe entweder in der entnommenen Probe für die Dünnschichtchromatographie oder auf der Kieselgelplatte durch das Bortrifluoridetherat hydrolysiert wird.

In der Reaktionslösung war zu diesem Zeitpunkt vermutlich noch keine Umsetzung beobachtbar. Mit fortschreitender Reaktionszeit wurde das benzyldengeschützte Pentasaccharid **41** im Verlauf der Dünnschichtchromatographie nicht mehr angegriffen, oder das gebildete Hexasaccharid **44** war gegenüber der Hydrolyse des Benzylidenacetals stabiler als das Edukt **41**.

Eine deutliche Verbesserung der Ausbeute an Hexasaccharid **44** ergab sich erst durch den Wechsel des Lösungsmittels. Unter Verwendung von 3 Äquivalenten Bortrifluoridetherat in Acetonitril als Lösungsmittel konnte die Ausbeute einer Testreaktion auf knapp 80 % bzw. bei Einsatz größerer Substanzmengen auf 76 % gesteigert werden.

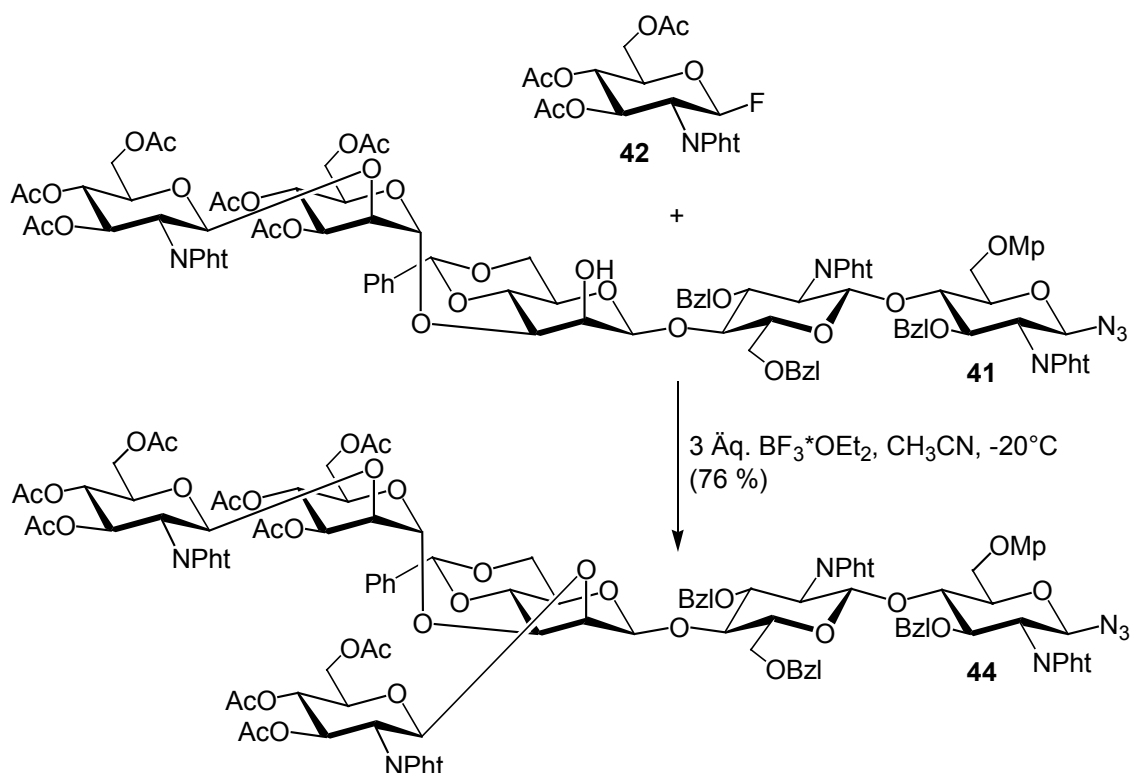


Abb. 3.21: Optimierte Reaktion mit drei Äquivalenten Bortrifluoridetherat in Acetonitril als Lösungsmittel.

Die für die Einführung des α -1,6-Arms erforderliche Entfernung des Benzylidenacetals erfolgte mit *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat in Acetonitril in 89 % Ausbeute.

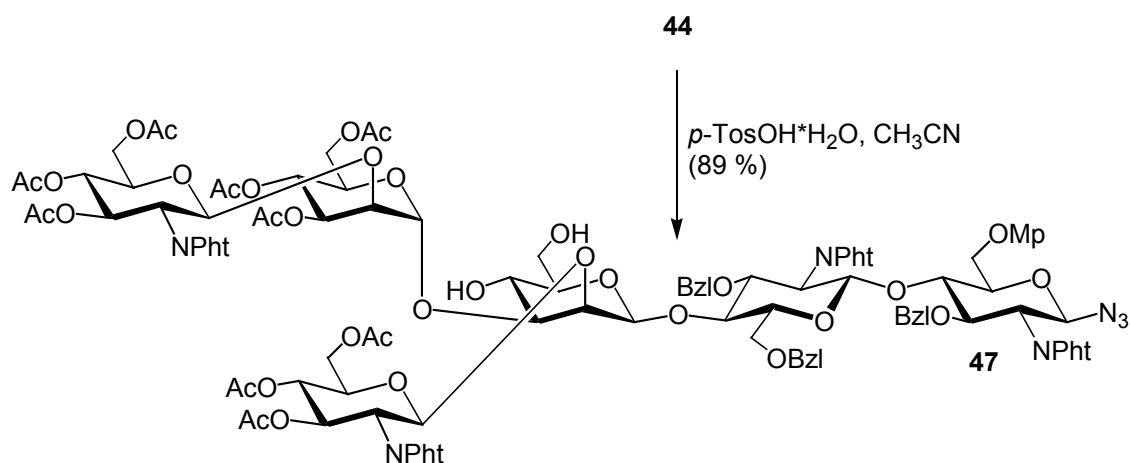


Abb. 3.22: Saure Abspaltung der Benzylidenschutzgruppe.

3.1.3 Synthese des LEC14-Nonasaccharids

Das Diol **47** konnte mit dem Imidat **40**^[96,126,127] in Dichlormethan bei -45°C unter Aktivierung durch Bortrifluoridetherat regio- und stereoselektiv zu dem biantennären Octasaccharid **48** umgesetzt werden. Um dabei die unerwünschte Glycosylierung^[96] an der bisecting-Position (OH-4'') zu vermeiden, erfolgte die Umsetzung in verdünnter Lösung und bei tiefen Temperaturen.^[24,100,126]

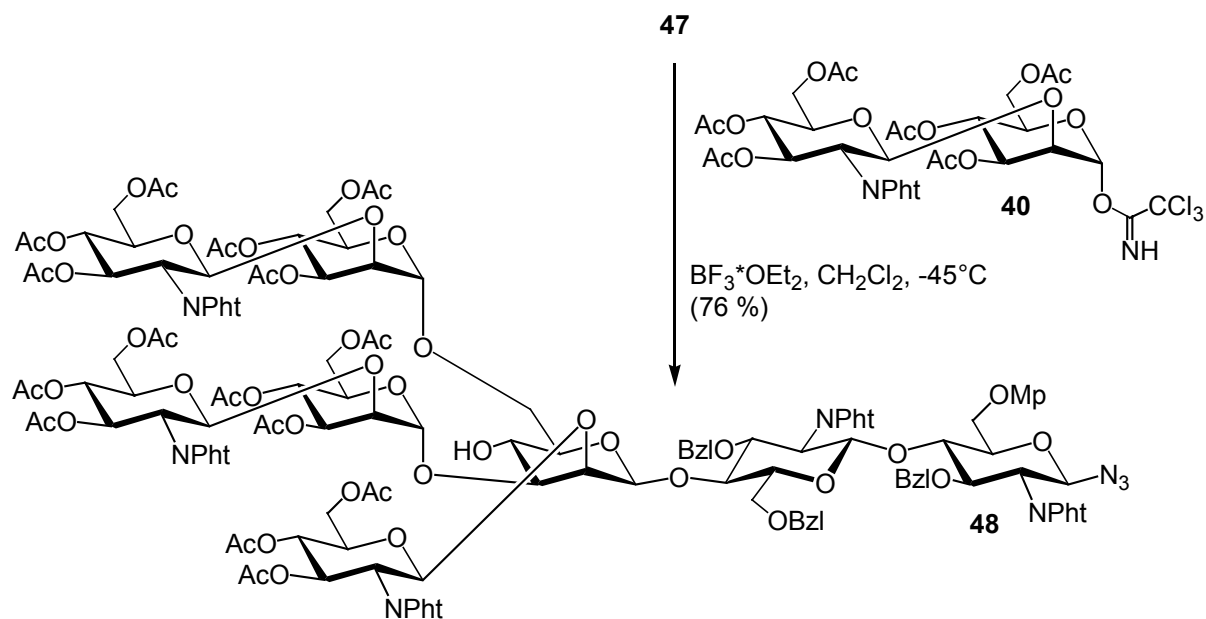


Abb. 3.23: Regioselektive Glycosylierung an OH-6''.

Das Octasaccharid **48** wurde mit Pyridin-Essigsäureanhydrid an der freien OH-4''-Funktion mit einer Acetylgruppe geschützt, um Nebenreaktionen bei der späteren Einführung des Fucosylrestes zu vermeiden.

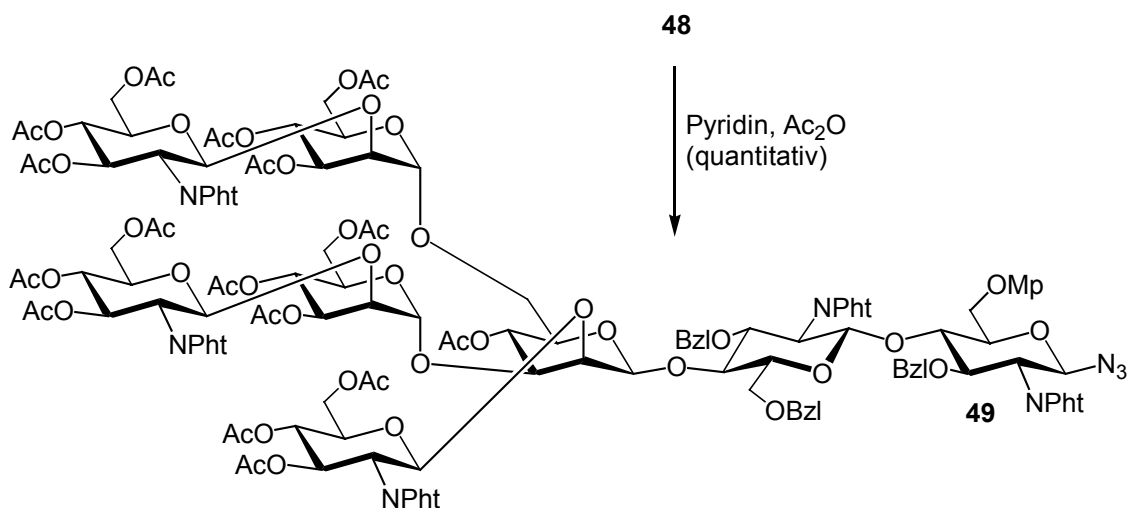


Abb. 3.24: Schutz der freien 4''-OH-Funktion als Vorbereitung der späteren Fucosylierung.

Die Abspaltung der *p*-Methoxyphenylschutzgruppe am reduzierenden Zucker mit Cer-(IV)-ammoniumnitrat verlief in einem Gemisch aus Toluol / Acetonitril / Wasser in 94 % Ausbeute.

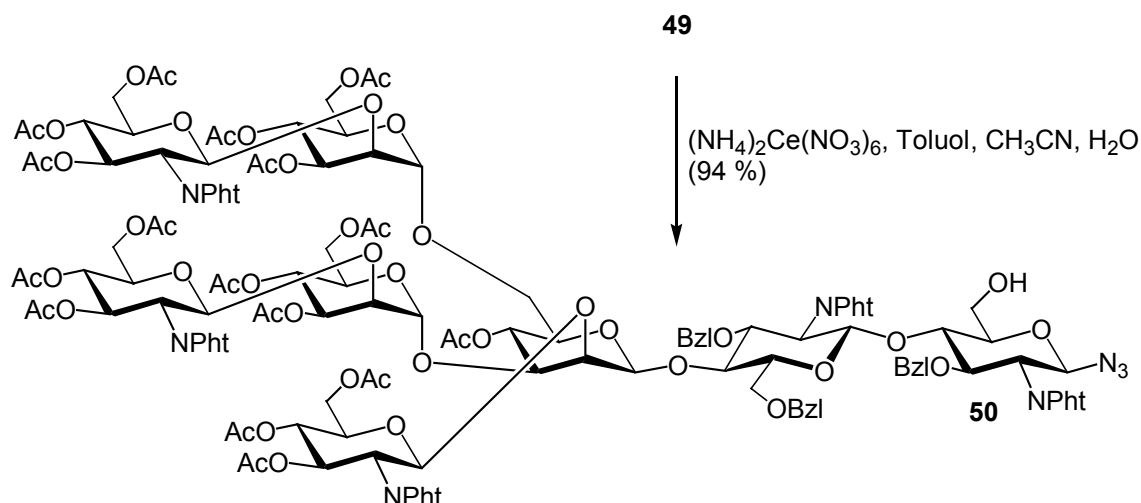


Abb. 3.25: Generieren der freien OH-6-Funktion zur Vorbereitung der Fucosylierung.

Die Umsetzung mit dem Ethylthiofucosid **51** erfolgte in Dichlormethan und Dimethylformamid mit Kupfer(II)bromid und Tetrabutylammoniumbromid zum geschützten LEC14-Nonasaccharid **52** in 82 % Ausbeute.

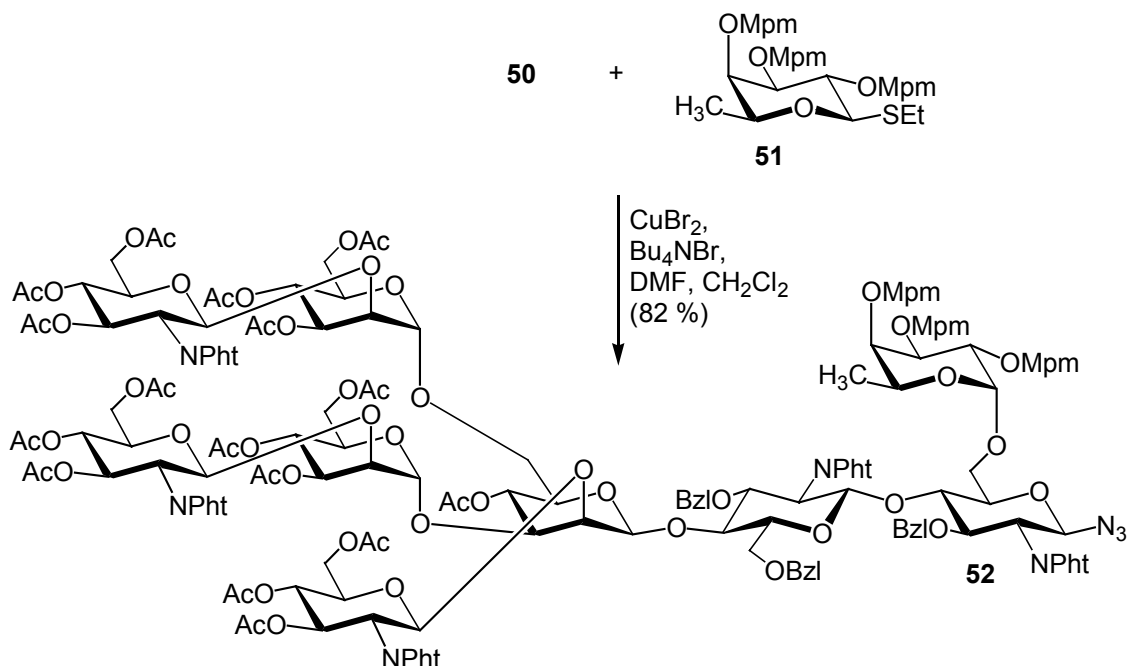


Abb. 3.26: Synthese des LEC14-Nonasaccharids.

3.1.4 Entschützung und Kupplung an einen Aminohexanoylspace

Die enzymatischen Glycosylierungen sollten an dem Nonasaccharid **57** erfolgen, das mit einem 6-Aminohexanoylspace für die Konjugation mit Proteinen vorbereitet ist.

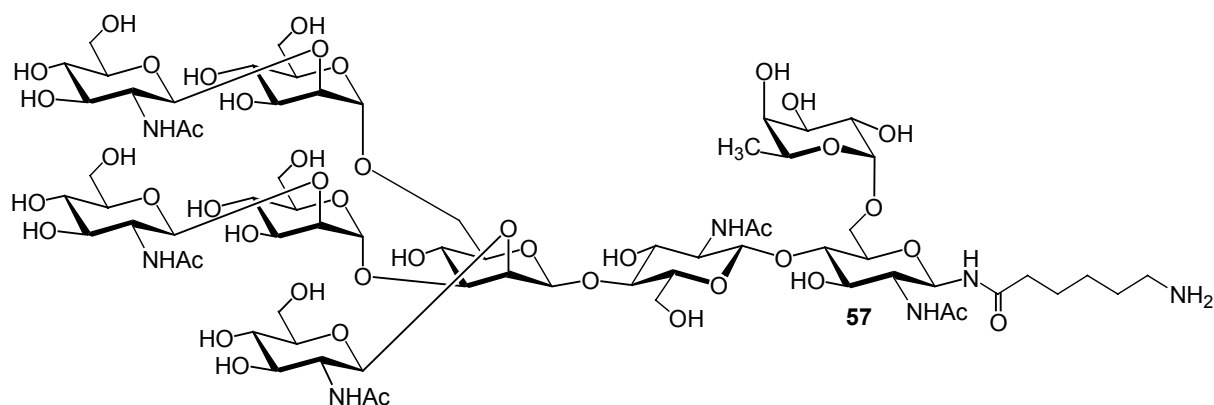


Abb. 3.27: Das für enzymatische Verlängerungen verwendete Nonasaccharid **57**.

Dazu wurden zunächst die drei *p*-Methoxybenzylschutzgruppen in Verbindung **52** mit dem stark sauren Cer(IV)-ammoniumnitrat oxidativ entfernt,^[98] was jedoch erst nach einigen Versuchen in akzeptabler Ausbeute (71 %) gelang. Daher sollte die Verwendung milderer Abspaltungsreagentien erwogen werden.

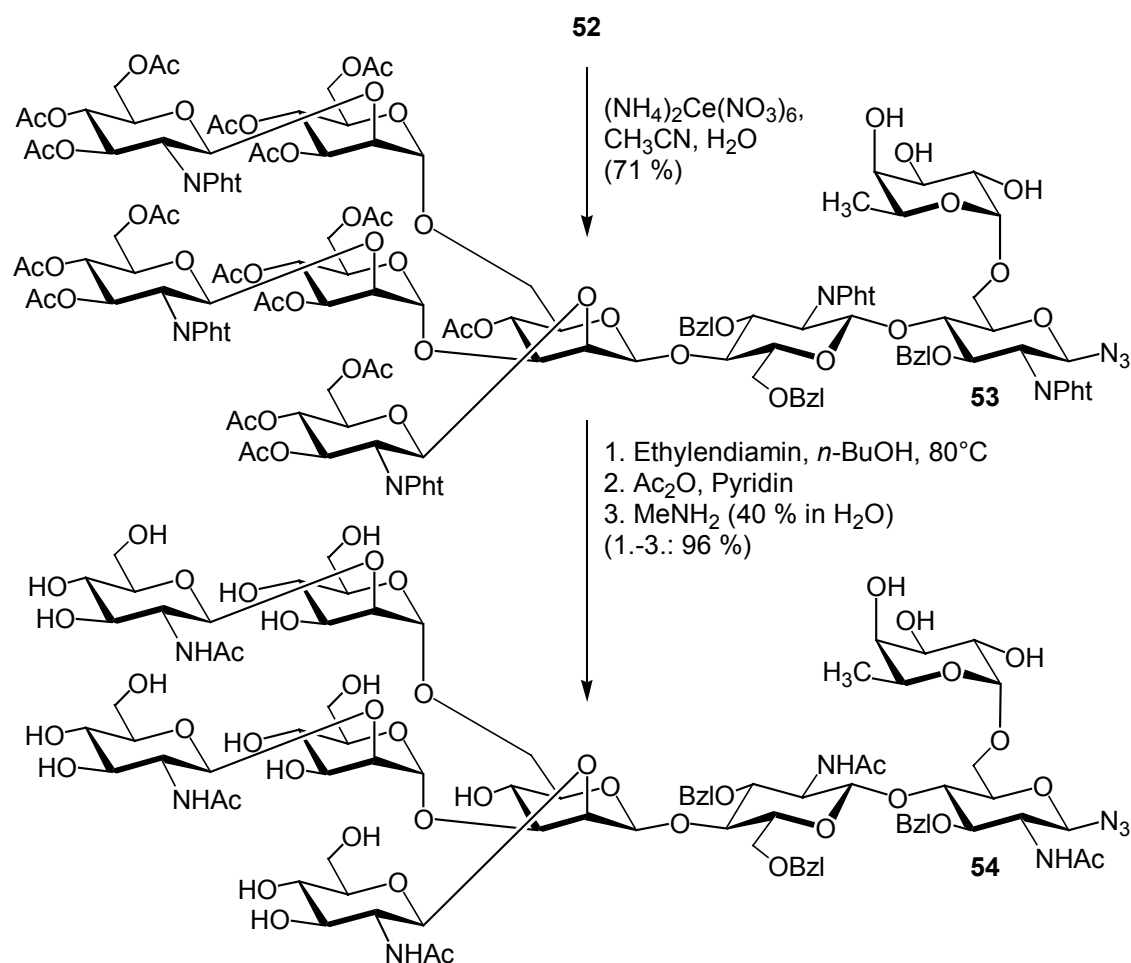


Abb. 3.28: Entschützen von Verbindung **52**.

Die Dephtaloylierung von Verbindung **53** erfolgte mit Ethylendiamin in *n*-Butanol bei 80°C. Die intermediär entstehende freie Aminoverbindung wurde ohne weitere Reinigung acetyliert

und anschließend wurden die *O*-Acetylgruppen mit einer wässrigen Methylaminlösung entfernt. Die drei letztgenannten Reaktionen wurden als Eintopfreaktion^[24] durchgeführt und verliefen mit der hohen Ausbeute von 96 %.

Verbindung **54** wurde mittels Festphasenextraktion an Waters Sep-Pak RP-18-Kartuschen gereinigt und nach der Reduktion zur Kupplung des 6-Aminohexanoylspacers eingesetzt. Die Reduktion des Glycosylazids **54** erfolgte mit Propandithiol und Triethylamin in absolutem Methanol und generierte das β -Glycosylamin, das nach Abdestillieren der Reagenzien sofort mit *Z*-Aminohexansäure **55** unter Aktivierung durch TBTU / HOBt gekuppelt wurde. Bei den ersten Testversuchen wurde eine bisher nicht beschriebene Überreaktion in Form von *O*-Acylierung zusätzlich zur gewünschten *N*-Acylierung am reduzierenden Ende beobachtet.^[96,98] Daher wurde nach Reaktionsende Methylamin (40 % in Wasser) zugegeben, um eine eventuell entstandene *O*-Acylierung rückgängig zu machen bzw. weitere *O*-Acylierung beim Einengen des Lösungsmittels zu verhindern. Sowohl die Freisetzung des Amins wie auch die Kupplung des Aminohexanoylspacers verliefen laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle vollständig, jedoch konnte mit dem RP-HPLC-System nach Reinigung nur eine Ausbeute von 31 % erzielt werden. Aufgrund der beobachteten Probleme scheint eine Vorreinigung mittels Ausschlusschromatographie sinnvoll.

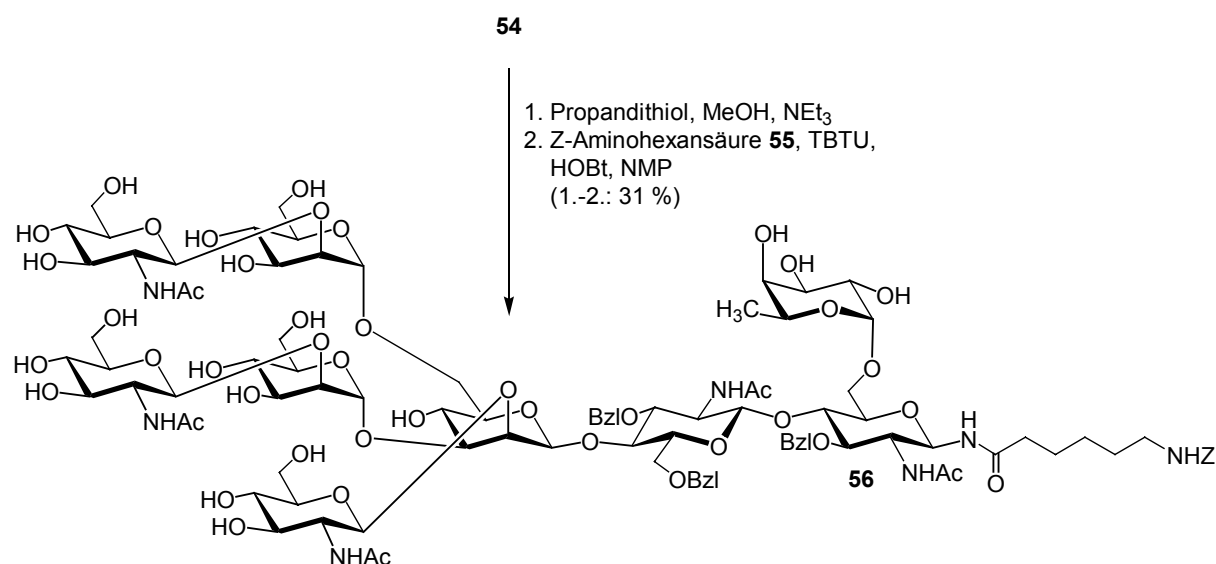


Abb. 3.29: Konjugation des Nonasaccharids **54** mit *Z*-Aminohexansäure **55**.

Die abschließende Hydrierung von Verbindung **56** mit Palladiumoxidhydrat in Methanol lieferte in sehr guter Ausbeute (95 %) die vollständig entschützte Verbindung **57**, die das Edukt für die enzymatischen Glycosylierungen darstellt.

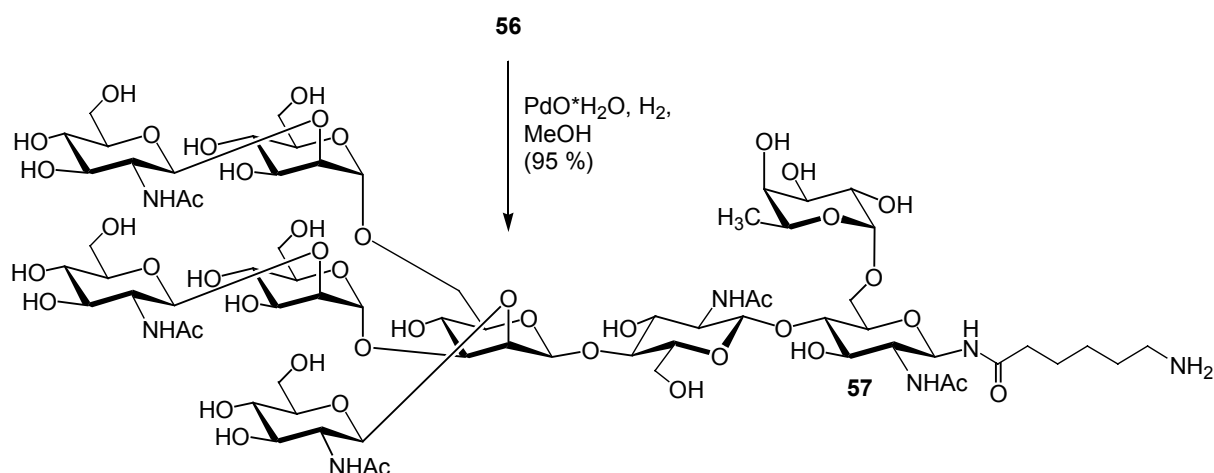


Abb. 3.30: Entschützung zum Akzeptorsubstrat **57** der nachfolgenden enzymatischen Synthesen.

Die Verbindung **57** ermöglicht erstmals einen Vergleich zu dem von *P. Stanley*^[47] isolierten Lec14-Saccharid mit der vorgeschlagenen Struktur **58**. Die beiden Verbindungen **57** und **58** unterscheiden sich nur im Aglykon. Im isolierten Naturstoff wurde Asparagin gefunden, bei der chemischen Synthese des Nonasaccharids wurde ein Aminohexanoylspacer am reduzierenden Ende verwendet.

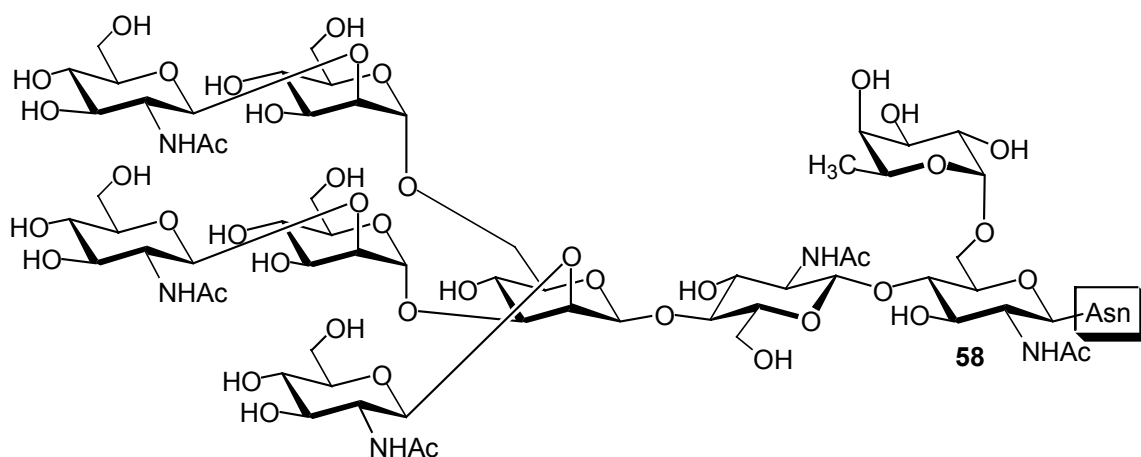


Abb. 3.31: Von *P. Stanley* vorgeschlagene Struktur des Lec14-Oligosaccharids.^[47]

Ein Vergleich der von *P. Stanley* gefundenen ¹H-Verschiebungen mit den Werten der synthetisierten Verbindung **57** ergeben trotz des unterschiedlichen Substituenten am reduzierenden Ende eine in weiten Bereichen sehr gute Übereinstimmung, die den Strukturvorschlag stützt. Speziell die Verschiebung des anomeren Protons des neuartig verknüpften *N*-Acetylglucosamins (Rest 7) stimmt sehr gut mit dem beschriebenen Wert überein und spricht somit auch für eine β -konfigurierte Verknüpfung im isolierten Naturstoff.

3. Chemo-enzymatische Synthese des Lec14-*N*-Glycans

Atom ^{Ring}	Lec14-Struktur 58 (<i>P. Stanley</i> ^[47])	Lec14-Nonasaccharid 57
1 ¹	5.07	5.03
1 ²	4.57	4.71
1 ³	(4.75)	4.77
2 ³	4.21	4.37
1 ⁴	5.11	5.11
2 ⁴	4.12	4.14
1 ^{4'}	4.88	4.89
2 ^{4'}	3.96	4.06
1 ⁵	4.54	4.49
1 ^{5'}	4.54	4.53
1 ⁷	4.68	4.69
1 ^F	4.86	4.87
NAc	2.09, 2.08, 2.05, 2.05, 2.01	2.08, 2.04, 2.04, 2.03, 1.99
6 ^F	1.20	1.20

Tab. 3.1: Vergleich der ¹H-NMR-Daten der Verbindungen **58** und **57**; Daten der Verbindung **58** wurden aufgenommen an einem 500MHz Varian Spektrometer bei 23°C (Die Verschiebung von H-1³ wurde bei 42°C gemessen) in D₂O mit Aceton als Standard. Verbindung **57** wurde an einem Bruker AM-500-FT-Spektrometer bei 25°C in D₂O mit DMSO als Standard gemessen und zum besseren Vergleich auf das H-6 der Fucose von Verbindung **58** geeicht.

3.2 Enzymatische Glycosylierungen

Das synthetische *N*-Glycankonjugat **57** sollte mit Hilfe von Glycosyltransferasen enzymatisch verlängert werden, um Strukturen zu erhalten, wie sie auch im lebenden Organismus auftreten. Dabei bietet die Verwendung von Enzymen gegenüber der chemischen Synthese u.a. folgende Vorteile:

- Enzymatische Glycosylierungen verlaufen mit ausgezeichneter Regio- und Stereoselektivität.
- Es sind keine Schutzgruppen notwendig, d.h. man spart Schützungs- und Entschützungs-schritte und erhält direkt aus der Enzymreaktion das gewünschte Produkt.
- Der Einsatz organischer Lösungsmittel und giftiger Reagenzien, wie z.B. Schwermetallsalze, wird vermieden.

Viele Glycosyltransferasen sind mittlerweile kommerziell erhältlich. Nachteilig ist jedoch der hohe Preis. Neuere Arbeiten^[128,129] haben gezeigt, dass Glycosyltransferasen neben den natürlichen Substraten auch zahlreiche unnatürliche Substrate mit unterschiedlichsten Modifizierungen tolerieren. Darüber hinaus erlauben die meisten Enzyme den Zusatz von bis zu 15 % Dimethylsulfoxid ohne Beeinträchtigung der Glycosylierung, so dass auch lipophilere Verbindungen umgesetzt werden können.

Die für die vorliegende Verbindung **57** beabsichtigten enzymatischen Verlängerungen wurden von *C. Unverzagt* entwickelt^[130] und erfolgreich in Synthesen komplexer *N*-Glycane angewandt.^[98] Während der Reaktion entsteht aus dem Nucleotidzucker UDP-Galactose das Nucleotidphosphat UDP. Dies ist ein starker Inhibitor der Galactosyltransferase und setzt die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich herab. Durch den Zusatz von alkalischer Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) wird das Nucleotidphosphat rasch zu dem korrespondierenden Nucleosid hydrolysiert,^[131,130] dessen Inhibitorwirkung für den Glycosyltransfer vernachlässigbar ist. Auf diese Weise werden in kurzer Zeit sehr gute Ausbeuten erhalten.

Zur enzymatischen Galactosylierung wurde das Akzeptorsubstrat in einem Kakodylatpuffer mit pH = 7.4 gelöst. Der Puffer enthielt Natriumazid, Rinderserumalbumin und Mangan(II)chlorid. Es wurden nacheinander UDP-Galactose, alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und die Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22) zugegeben und bei 37°C inkubiert.

Eine erste Galactosylierungsreaktion mit der benzylierten Verbindung **54** unter Verwendung des üblichen geringen Überschusses an UDP-Galactose zeigte neben den erwarteten enzymatischen Verlängerungen der *N*-Acetylglucosamine des α -1,3- und α -1,6-Arms auch eine unerwartete Galactosylierung des in Position 2'' befindlichen *N*-Acetylglucosamins.

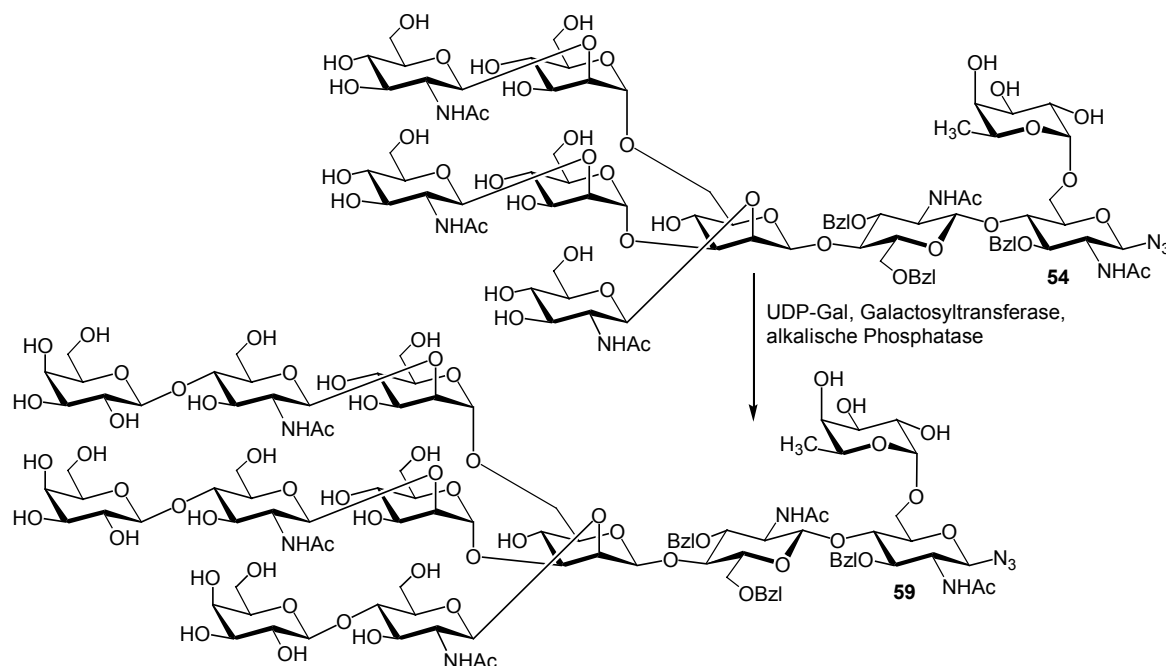


Abb. 3.32: Der Glucosaminrest in Position 2'' wird ebenfalls enzymatisch verlängert.

Obwohl bekannt ist, dass Enzyme neben ihren natürlichen Substraten auch ungewöhnliche und sogar unnatürliche Substrate glycosylieren können,^[128,129] ist dieser Befund überraschend, da eine Verlängerung von bisecting-*N*-Acetylglucosaminresten durch Galactosyltransferasen bisher nicht beschrieben ist,^[29,132] und das *N*-Acetylglucosamin in Position 2'' von Verbindung **54** bzw. **57** als ähnlich sterisch gehindert angesehen wurde.

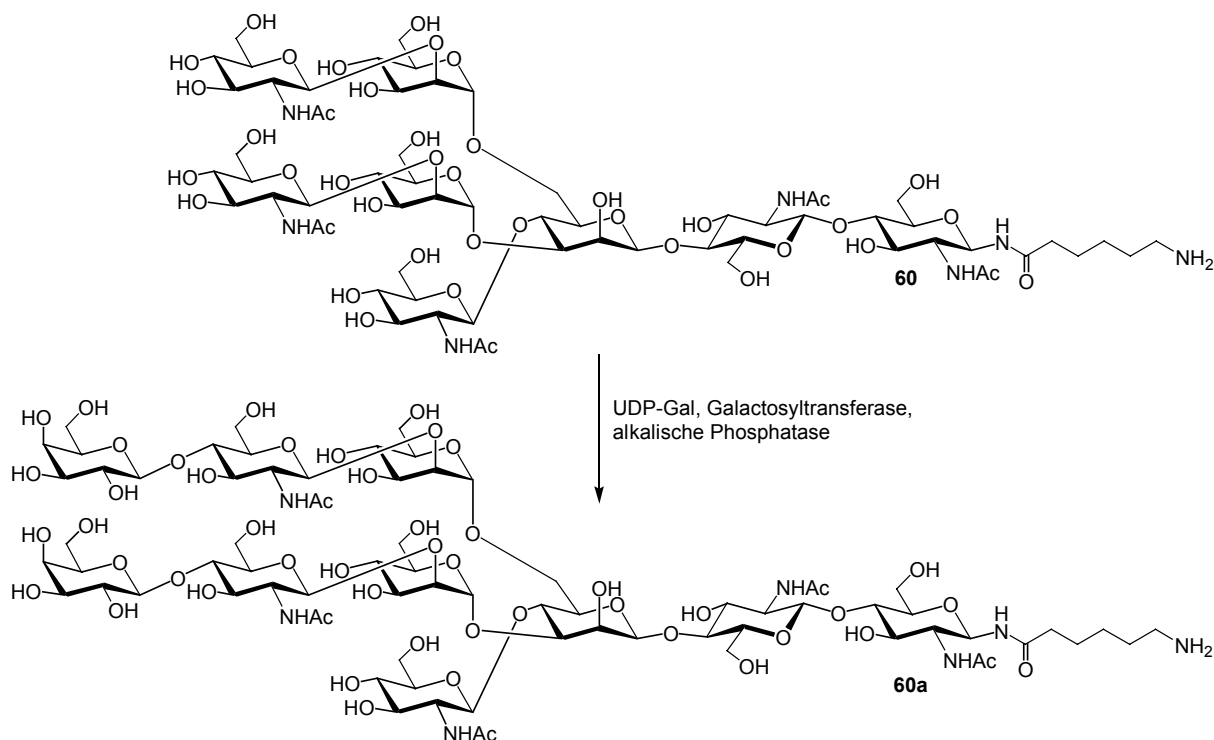


Abb. 3.33: Enzymatische Verlängerung der biantennären bisecting-Verbindung **60**. Hierbei wird keine Glycosylierung des *N*-Acetylglucosamins in Position 4'' gefunden.^[29]

Um die Regioselektivität der enzymatischen Verlängerung bei Verbindung **57** nachzuprüfen, wurde das Substrat zunächst mit einem Äquivalent UDP-Galactose umgesetzt. Hierbei wurde nach Gelfiltration Verbindung **61** erhalten. Durch NMR-Messungen wurde eine Selektivität der Galactosylierung des α -1,3-Arms gegenüber dem α -1,6-Arm von mehr als 3.8 : 1 gefunden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der literaturbeschriebenen Präferenz enzymatischer Verlängerungen für den α -1,3-Arm.^[132,133]

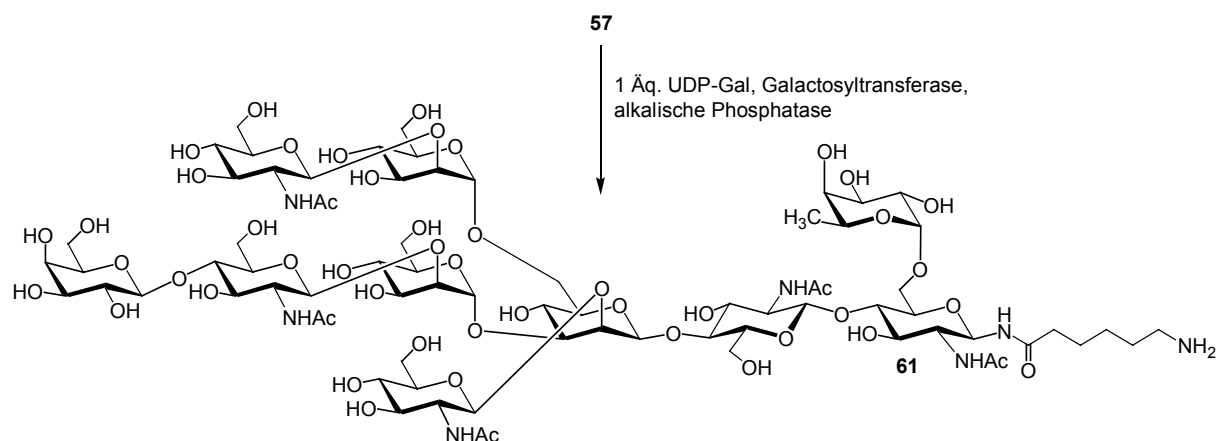


Abb. 3.34: Enzymatische Galactosylierung mit einem Äquivalent UDP-Gal führt zur regioselektiven Verlängerung des α -1,3-Arms.

Mit einem weiteren Äquivalent UDP-Galactose konnte die zweifach galactosylierte Verbindung **62** erhalten werden. NMR-Experimente bestätigten die Galactosylierung des 1,6-Arms vor der Galactosylierung des neuartig verknüpften *N*-Acetylglucosamins. Bei der Darstellung von **62** wurde offensichtlich ein geringer Überschuss UDP-Galactose verwendet, so dass ca. 20 % des Akzeptorsubstrats zu dem pergalactosylierten Produkt **63** weiterreagierten. Die zweifach bzw. dreifach galactosylierten Verbindungen **62** und **63** ließen sich nicht mehr durch Gelfiltration (Superdex / Bicarbonat) trennen.

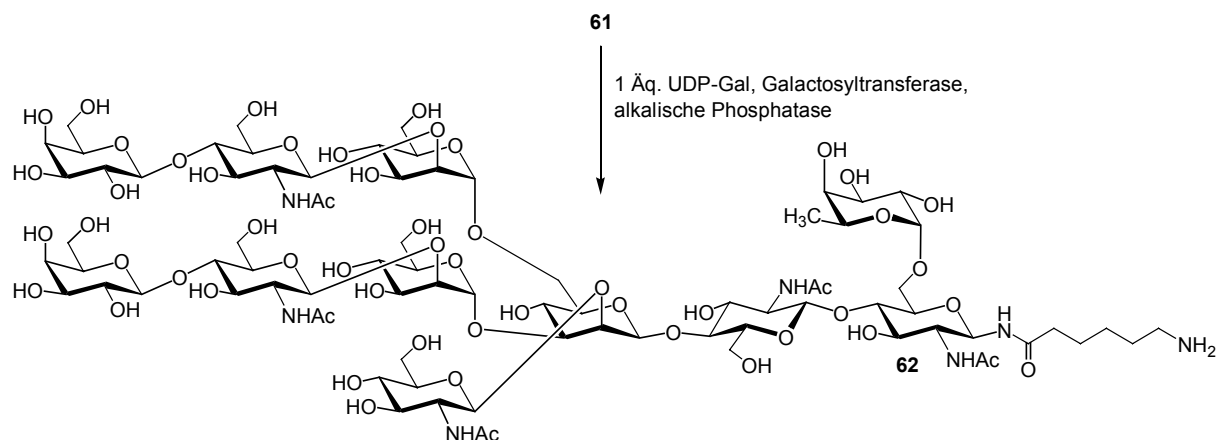


Abb. 3.35: Enzymatische Galactosylierung von Verbindung **61** mit einem weiteren Äquivalent UDP-Gal führt zur regioselektiven Verlängerung des 1,6-Arms.

Die Di-Galactoverbindung **62** wurde schließlich mit einem Überschuss von UDP-Galactose zur pergagalactosylierten Verbindung **63** umgesetzt. Dies ist die erste Synthese eines biantennären *N*-Glycans, das neben den Antennen ein neues Verzweigungsmotiv aufweist, das enzymatisch verlängert werden kann.

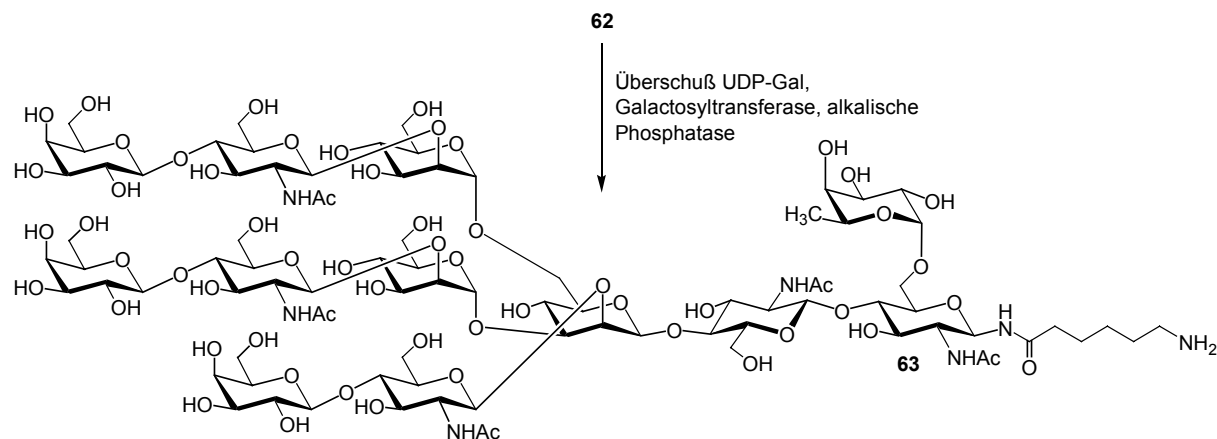


Abb. 3.36: Enzymatische Galactosylierung von Verbindung **62** mit einem Überschuss von UDP-Gal führt zur unerwarteten pergagalactosylierten Verbindung **63**.

Da die Pergalactosylierung problemlos durchzuführen war, sollte geprüft werden, ob auch eine Persialylierung mit α -(2,3)-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.6) erzielt werden kann. Zur enzymatischen Sialylierung wurde das Akzeptorsubstrat **63** in einem Kakodylatpuffer mit pH = 6.5 gelöst. Der Puffer enthielt Natriumazid und Rinderserumalbumin. Es wurde nacheinander ein Überschuss an CMP-*N*-Acetylneuraminsäure, alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und die α -(2,3)-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.6) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Bei einer nach 2 Stunden entnommenen Probe zeigte sich im ESI-MS neben wenig unsialyliertem Edukt, einfacher und doppelter Sialylierung auch schon ein geringer Anteil des dreifach sialylierten Produkts **64**. Nach 48 Stunden bildete die persialylierte Verbindung **64** laut Massenspektrometrie das Hauptprodukt.

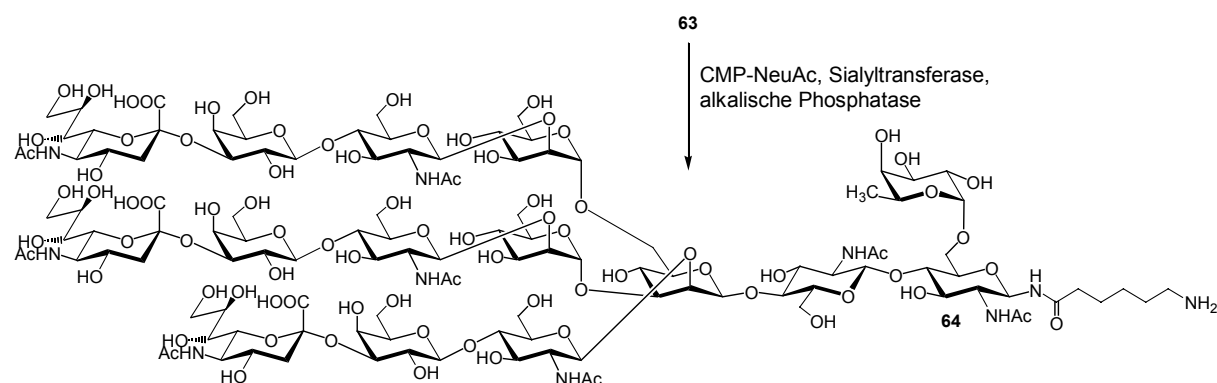


Abb. 3.37: Auch die α -(2,3)-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.6) akzeptiert den galactosylierten β -1,2-Arm als Substrat.

Bei der Isolierung des Lec14-Glycans wurden die Glycopeptide zur Entfernung der Neuraminsäuren zunächst mit 10 mM Salzsäure bei 80°C und dann mit einem Gemisch mehrerer verschiedener β -D-Galactosidasen und *N*-Acetyl- β -D-Glucosaminidasen^[47] behandelt. Daher besteht die Möglichkeit, dass eine eventuell mit dem β -1,2-*N*-Acetylglucosamin verknüpfte Galactose bzw. Neuraminsäure vor der Identifizierung abgespalten wurde. Die enzymatische Verlängerung des β -1,2-*N*-Acetylglucosamins sowohl mit Galactosyltransferase wie auch mit Sialyltransferase legt die Vermutung nahe, dass dieses Strukturmotiv auch bei *N*-Glycanen der betreffenden CHO-Zellen gebildet wird und somit natürlich auftritt.

Da bei Verbindung **57** die Galactosylierung und die anschließende Sialylierung an sämtlichen Verzweigungen möglich ist, bei der sterisch gehinderten bisecting-Verbindung **60** jedoch nur der α -1,3- und α -1,6-Arm verlängert werden, ist die Annahme ähnlicher sterischer Verhältnisse bei dem 1,2-verknüpften (**57**) und 1,4-verknüpften (**60**) *N*-Acetylglucosamin offensichtlich nicht gegeben. Die gefundenen Ergebnisse lassen sich durch „molecular modeling“ veranschaulichen. Die Berechnungen wurden mit dem über das Internet frei zugänglichen Programm „Sweet 2“^[134] der Abteilung „Zentrale Spektroskopie - Molecular Modeling“ des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg durchgeführt. Dort findet sich auch am Beispiel des Agglutinins aus Sojabohnen ein Vergleich verschiedener Kraftfeldmethoden (u.a. MM3, MM2, Amber etc.) sowie die betreffende Röntgenstruktur.^[135] Zur Berechnung wurden die Moleküle **57** und **60** in „Sweet 2“ eingegeben, wobei der Aminohexanoylspacer bzw. das in der Natur gefundene Asparagin am reduzierenden Ende der beiden Nonasaccharide durch eine Hydroxygruppe ersetzt wurden. Die Berechnung erfolgte für diese großen Strukturen mit ihren mehr als 220 Atomen in „Sweet 2“ mit dem MM3(96)-Kraftfeld aus dem Tinker-Programm.^[136] Die so erhaltenen Strukturen wurden als pdb-Datei in das Programm Spartan^[123] eingelesen und als 0.002 Elektronen/Bohr³-Oberflächenfunktion dargestellt.

Bei der grafischen Darstellung mit Spartan wurde zur Verbesserung der Übersichtlichkeit die *N*-Acetylgruppe am reduzierenden Zucker ausgeblendet, die Zuckerringe wurden abwechselnd hell bzw. dunkel eingefärbt. Das Core-Trisaccharid (Zucker 1, 2 und 3) wurde komplett hell belassen (**Abb. 3.38**).

Der Vergleich der beiden Strukturen zeigt, dass der bisecting-Rest (bis) von beiden Antennen flankiert ist und eng an dem α -1,3-Arm (Zucker 4 und 5) anliegt. Dies steht auch mit der experimentellen Beobachtung im Einklang, dass ein bisecting-Rest die Selektivität der Galactosyltransferase gegenüber dem α -1,3-Arm herabsetzt.^[132] Dadurch ist dieses

N-Acetylglucosamin kein Substrat für die verwendete Galactosyltransferase. Das β -1,2-verknüpfte *N*-Acetylglucosamin der Lec14-Verbindung (Rest 7) ist hingegen relativ frei zugänglich, was mit der beobachteten Galactosylierung in Einklang steht.

Die Isolierung und Identifizierung eines zellulären Lec14-*N*-Glycans mit enzymatischer Verlängerung durch Galactose und evtl. Neuraminsäure am β -1,2-, α -1,3- und α -1,6-Arm würde die Existenz eines bisher nicht beobachteten Verzweigungsmotivs bei *N*-Glycanen belegen und stellt somit eine äußerst interessante Herausforderung dar.

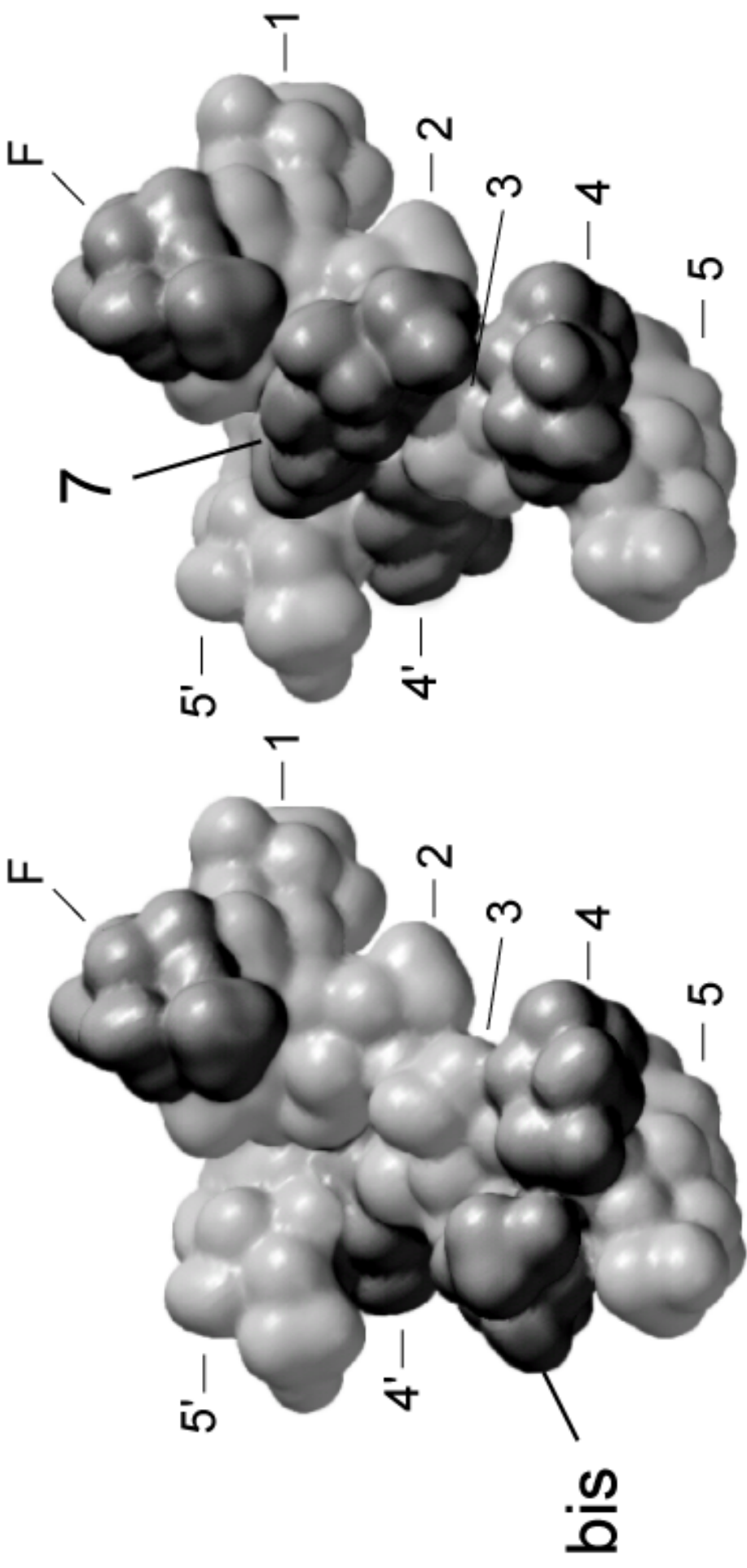


Abb. 3.38: Vergleich der bisected-Corestruktur (links) und der Lec14-Struktur (rechts; vgl. **Abb. 3.33** bzw. **Abb. 3.30**); aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die *N*-Acetylgruppe am reduzierenden Saccharid ausgeblendet. Zur Zuordnung der einzelnen Zuckerringe vgl. **Abb. 8.1**, S. 90.

4. Darstellung von LEC14-Neoglycoproteinen

Neoglycokonjugate bezeichnen allgemein Strukturen, bei denen Kohlenhydratanteile meist über einen Spacer mit Trägermolekülen verbunden sind. Als Trägermoleküle werden sehr häufig Proteine eingesetzt. Synthetisierte Glycoproteine, die nicht in der Natur vorkommen, werden als Neoglycoproteine bezeichnet. Der größte Vorteil von Neoglycokonjugaten bzw. Neoglycoproteinen gegenüber isolierten Glycoproteinen besteht darin, dass sie Kohlenhydrate bekannter Struktur und Reinheit aufweisen. Das Problem der Mikroheterogenität kann hier im Gegensatz zu den isolierten Glycoproteinen umgangen werden.

Die Anbindung des Kohlenhydratanteils an das Trägerprotein erfolgt bei der Darstellung von Neoglycoproteinen über verschiedene Aminosäuren bzw. deren funktionelle Gruppen. So ist z.B. die Aminofunktion der Seitenkette von Lysin sehr gut geeignet, um eine Verknüpfung mit Carbonsäuren, Carbonylverbindungen, Imidaten oder Isothiocyanaten zu erzielen.^[137]

Neoglycokonjugate lassen sich z.B. zur Isolierung kohlenhydratbindender Proteine einsetzen. Dazu werden die betreffenden Neoglycokonjugate z.B. an Sepharose immobilisiert und für Affinitätschromatographiesäulen verwendet. Auch die Bindungsspezifitäten von Lectinen bzw. Kohlenhydratbindungsstellen allgemein lassen sich mit Neoglycokonjugaten bestimmen. Dabei können Neoglycokonjugate leicht z.B. mit Fluoreszenz- oder radioaktiven Markern, aber auch Biotin versehen werden, was Bindungsassays stark vereinfacht. Durch die Verwendung von Fluoreszenzmarkern können Neoglycokonjugate darüber hinaus sehr einfach als cytochemische Marker für die Visualisierung von Kohlenhydratbindungsstellen in Gewebe eingesetzt werden. Gerade in der Tumorpathologie eignen sich Neoglycokonjugate, um Tumorgewebe zu visualisieren oder auch verschiedene Tumortypen zu unterscheiden. Eine weitere mögliche Anwendung besteht im Drug-targeting durch Neoglycokonjugate, die spezifisch z.B. an Tumorzellen binden. Auch kohlenhydratvermitteltes gezieltes Einbringen von DNA-Molekülen in bestimmte Zellen ist Gegenstand der Forschung.^[137]

Um das Lec14-Glycan auf Ligandeneigenschaften für Lectine, für Tumorzellen *in vitro* und auf die Bioverteilung in Tumormäusen untersuchen zu können, wurde das Neoglycokonjugat **66** dargestellt. Die damit gewonnenen Ergebnisse können verglichen werden mit den Untersuchungen an Neoglycokonjugaten von Rinderserumalbumin (BSA) mit biantennären galactosylierten und sialylierten *N*-Glycanstrukturen^[26] bzw. core-fucosylierten *N*-Glycanen.^[138]

Zur Darstellung des Neoglycoproteins **66** wurde Verbindung **63** an kohlenhydratfreies BSA gekoppelt. Dazu wurde das freie Amin **63** zunächst mit Thiophosgen in Wasser /

Dichlormethan unter milden Bedingungen in das Isothiocyanat **65** überführt.^[96,98] Das überschüssige Thiophosgen wurde nach Reaktionsende (Kontrolle durch Dünnschichtchromatographie) in mehreren Waschschritten entfernt. Anschließend wurde das Isothiocyanat **65** mit BSA umgesetzt, wo es an die basische Seitenkette von Lysinresten bindet. Die abschließende Reinigung erfolgte durch Ausschlusschromatographie.

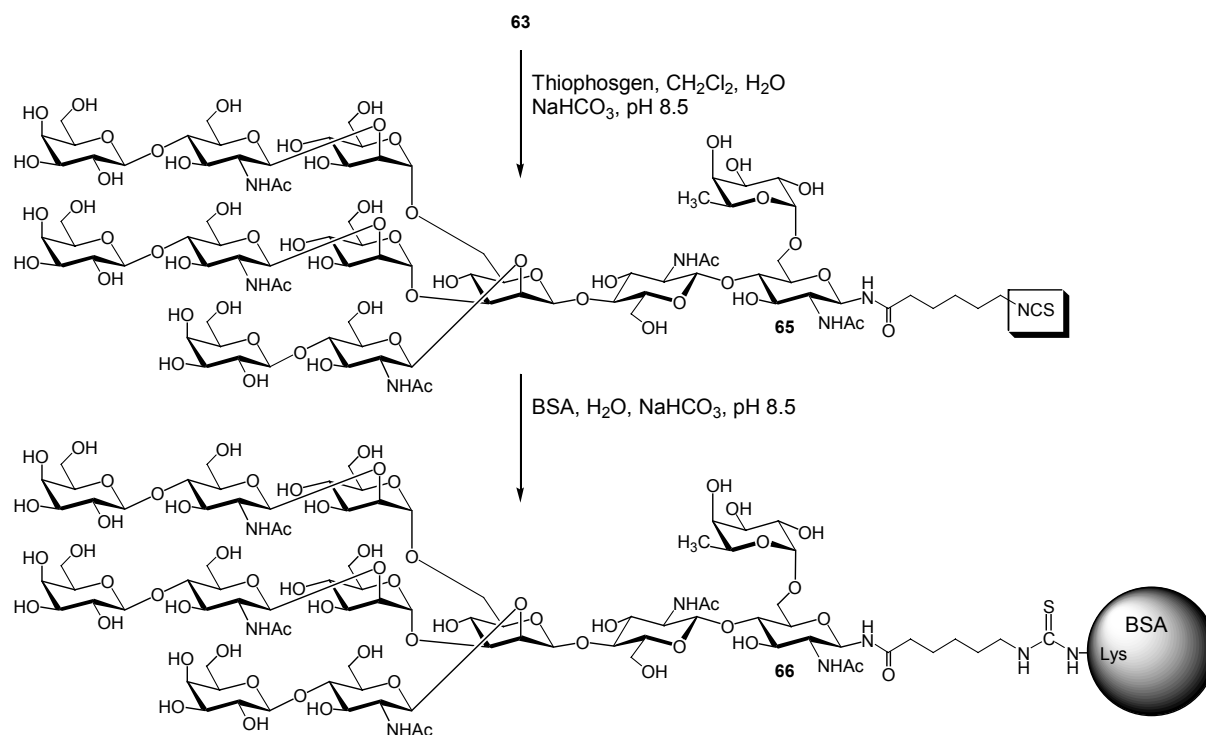


Abb. 4.1: Überführen des freien Amins **63** in das Isothiocyanat **65** und Kupplung an BSA.

Anhand der quantitativen Kohlenhydratanalyse,^[139] die durch MALDI-TOF-Spektren gestützt wurde, wurden Belegungen von durchschnittlich 3.2 *N*-Glycaneinheiten pro Trägermolekül gefunden.

Mit Verbindung **66** steht erstmals ein Neoglycokonjugat mit dem Lec14-*N*-Glycan für weitere Untersuchungen zur Verfügung. In einer umfassenden Studie soll dieses Konjugat mit anderen Konjugaten^[26,138] verglichen werden. Speziell der Vergleich der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Lec14-Struktur mit dem von J. Seifert^[29] synthetisierten bisecting-Motiv ist interessant, da sich beide Strukturen nur in der Position der β -1,4-Verknüpfung eines *N*-Acetylglucosamins unterscheiden, aber alleine aufgrund der gefundenen Besonderheiten bezüglich der enzymatischen Verlängerung große Unterschiede sowohl bei der Konformation als auch bei der damit verbundenen Wirkung auf Kohlenhydratbindungsstellen zu erwarten sind.

5. NOD-Faktoren und Analoga: Darstellung und Aktivität

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, NOD-Faktoren und Analoga zu synthetisieren (Kapitel 5.1). Ein Teil der Verbindungen sollte in Wurzelhaartests an *Medicago sativa* bezüglich der Fähigkeit zur Knöllchenbildung mit einem isolierten, natürlichen NOD-Faktor verglichen werden (Kapitel 5.2.1). Weiterhin sollte die Wirkung speziell der leicht und im großen Maßstab zugänglichen Acylmonoglycoside auf die Keimfähigkeit und das Wachstum von Weizen und Mais getestet werden (Kapitel 5.2.2). Darüber hinaus wurden Untersuchungen der Wirkung von Acylmonoglycosiden auf die T-Zell-Proliferation durch den Arbeitskreis von *Gerd Pluschke* vorgenommen (Kapitel 5.2.3).

5.1 Darstellung von monomeren Glucosaminderivaten als NOD-Faktor-analoga

Zunächst wurde Glucosaminhydrochlorid **67** an Position 2 mit Fettsäuren verschiedener Länge versehen, um Verbindungen zu erhalten, die dem nichtreduzierenden Ende der natürlichen NOD-Faktoren ähnlich sind. Dazu wurde aus D-Glucosaminhydrochlorid mit Base das Amin freigesetzt und dieses anschließend *N*-acyliert. Die ersten Versuche wurden mit Triethylamin als Base, den freien Carbonsäuren und HOBt / EDC als Kupplungsreagenzien in einem Ethanol / Wassergemisch durchgeführt. Die Ausbeuten waren hoch, jedoch musste zur vollständigen Abtrennung von HOBt und dem Harnstoffderivat das Rohprodukt zunächst peracetyliert, säulenchromatographisch gereinigt und anschließend wieder deacetyliert werden. Auf diese Weise wurden Derivate von Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Behensäure ($C = 6, 8, 10, 12, 14, 16$ und 22) hergestellt. Das Palmitinsäurederivat **70** wurde auch schon von *Dazzo* und *Hollingsworth* synthetisiert und in Pflanzentests eingesetzt.^[92]

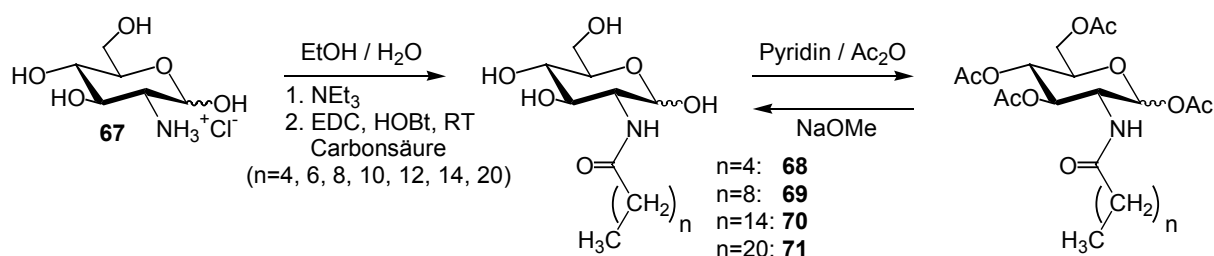


Abb. 5.1: *N*-Acylierung von Glucosamin; der Acetylierungs- und Entschüttungsschritt dient lediglich der Reinigung.

Für biologische Untersuchungen wurden einige der Acylderivate auch über einen alternativen Weg unter Vermeidung von HOBt und EDC hergestellt. Hierfür bot sich die Freisetzung des

Amins aus dem D-Glucosaminhydrochlorid mittels Natrium in Methanol an, danach erfolgte direkte Zugabe des betreffenden Carbonsäurechlorids. Die Ausbeute war bei dieser Reaktion aufgrund der Bildung des Carbonsäuremethylesters bzw. der Hydrolyse des Säurechlorids gering. Dennoch wurde diese Reaktion verwendet, da das Produkt nur mit dem Carbonsäurechlorid und Natriummethoxid in Berührung kommt und leicht durch Waschen / Zentrifugieren von den Edukten zu reinigen ist. Auf diese Weise wurden das Capron-, Capryl- und Palmitinsäurederivat für Testzwecke synthetisiert.

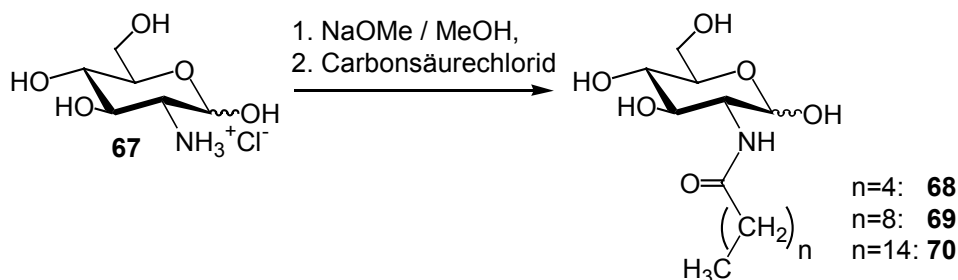


Abb. 5.2: N-Acylierung von Glucosamin mit Carbonsäurechloriden in Methanol.

Darüber hinaus wurden Analoga hergestellt, die an Position 2 N-acetyliert sind und am anomeren Kohlenstoffatom als O-Glycosid^[140] bzw. N-Glycosid^[141] vorliegen.

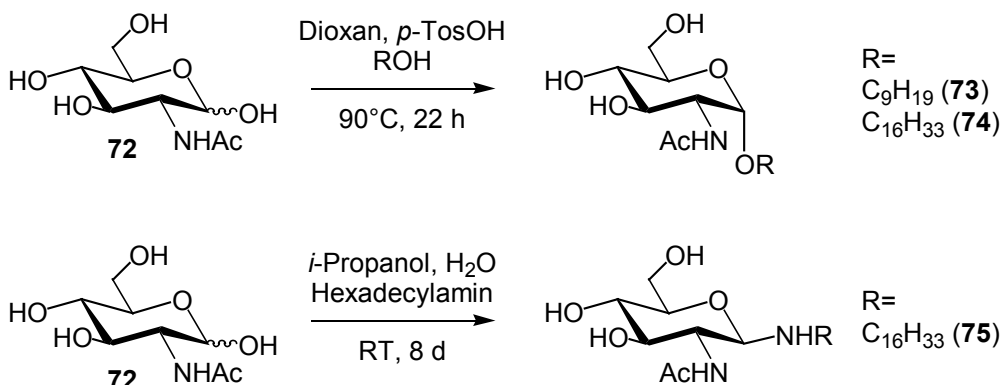


Abb. 5.3: Weitere Analoga, am anomeren Zentrum O- bzw. N-alkyliert.

Die oben beschriebenen Substanzen wurden für verschiedene Untersuchungen verwendet.

5.2 Biologische Untersuchungen mit monomeren Glucosaminderivaten

5.2.1 Einfluss monomerer Glucosaminderivate auf das Wurzelhaarwachstum

Die Fähigkeit der Substanzen zur Knöllchenbildung bei Leguminosen wurde unter Anleitung und Hilfe von Herrn K. Niehaus im Arbeitskreis Pühler an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld getestet. Die verwendeten Materialien und Methoden sind in Kapitel 8.11 beschrieben. Ein isolierter, natürlicher NOD-Faktor (freundlicherweise von Herrn

Niehaus zur Verfügung gestellt) wurde als Referenz auf die Wurzeln von *Medicago sativa* aufgebracht. Dies resultierte in typischen Verformungen der Wurzelhaare verglichen mit unbehandelten Wurzeln und ließ sich mikroskopisch dokumentieren.

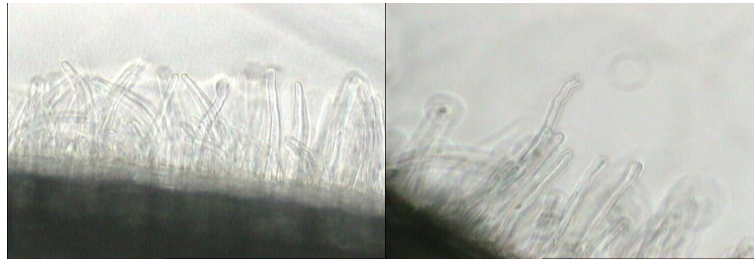


Abb. 5.4: Aufnahmen unbehandelter Wurzelhaare von *Medicago sativa* (Luzerne).

Anstelle der schlanken, geraden Form unbehandelter Wurzelhaare (**Abb. 5.4**) wurden bei Applikation des NOD-Faktors Verformungen, wie v.a. Einkrümmungen („root hair curling“) und Verzweigungen („branching“; **Abb. 5.5**), aber auch Haken („hooks“) und Wellen („wavy forms“) gefunden. Vor allem das „curling“ ist typisch für die Wirkung der NOD-Faktoren auf die korrespondierenden Leguminosen. Die unverwechselbare „Hirtenstab“-Form („shepard’s crook“), die eine 360°-Schleife der Wurzelhaarspitze beschreibt und ein extremes „curling“ darstellt, tritt auch vereinzelt durch Zugabe von isolierten NOD-Faktoren auf, ist jedoch typischer für Inokulation mit lebenden Rhizobien.



Abb. 5.5: Von links nach rechts sind typische Effekte der betreffenden NOD-Faktoren auf Wurzelhaare von *Medicago sativa* (Luzerne) dargestellt: curling bzw. „halber“ shepard’s crook, branching und ein größerer Wurzelbereich zum Überblick.

Da die synthetisierten Verbindungen **69**, **70** und **71** sehr schlecht bzw. nicht wasserlöslich sind, wurden sie in Dimethylsulfoxid gelöst und diese Lösungen 1:100 mit Wasser verdünnt, so dass 10^{-4} molare Lösungen erhalten wurden. Da Dimethylsulfoxid jedoch auch Auswirkungen auf das Wurzelwachstum hat, wurden zusätzlich Blindversuche mit Dimethylsulfoxid ohne Zugabe von Kohlenhydratderivaten durchgeführt. Bei Applikation von reinem Dimethylsulfoxid wurden vor allem „Keulen“, aber auch schraubenzieherartige Deformationen beobachtet, die für NOD-Faktoren typischen „curling“ und „shepard’s crook“-Strukturen wurden allerdings nicht gefunden. Die Wurzelhaarveränderungen aufgrund von

Dimethylsulfoxid sind im direkten Vergleich deutlich von NOD-Faktor-induzierten Veränderungen zu unterscheiden.

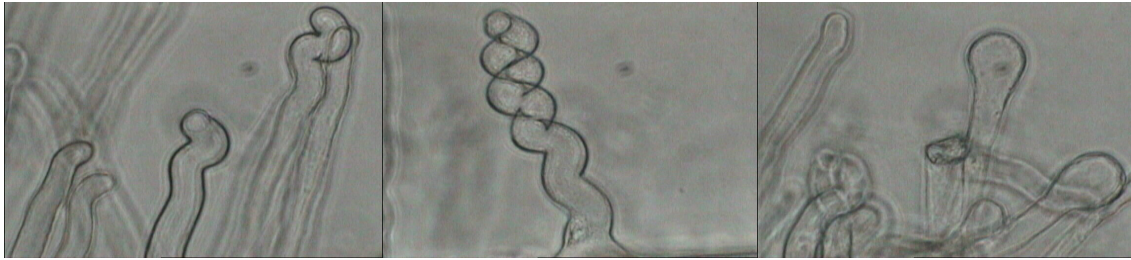


Abb. 5.6: Durch Dimethylsulfoxid verursachte wellenförmige, schraubenzieherartige und keulenförmige Veränderungen des Wurzelhaarwachstums.

Das Capronsäurederivat **68** konnte in reinem Wasser gelöst und somit ohne Dimethylsulfoxid appliziert werden. Jedoch wurden keine Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Testpflanzen gefunden. Bei der längerkettigen Caprinsäureverbindung **69** konnten nur vereinzelt Verzweigungsansätze („branching“) festgestellt werden, ansonsten waren auch hier keine sichtbaren Veränderungen zu beobachten.

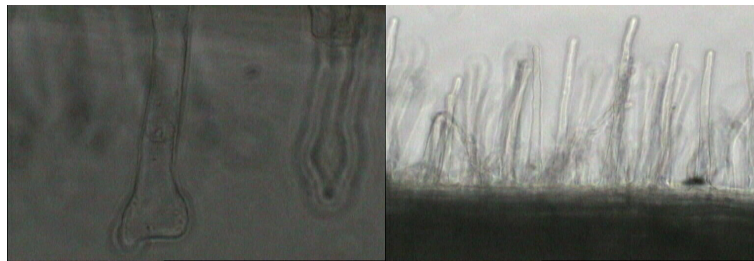


Abb. 5.7: Caprinsäurederivat **69** zeigt zwar vereinzelte „branching“-Ansätze, überwiegend aber werden unveränderte Wurzelhaare beobachtet.

Bei dem Palmitinsäurederivat **70** wurden Veränderungen beobachtet, darunter sogar ein „shepard’s crook“, über große Bereiche jedoch bleiben die Wurzelhaare unverändert, und die meisten der gefundenen Veränderungen, wie Wellenformen und Keulen, gehen vermutlich auf den Einfluss von Dimethylsulfoxid zurück.

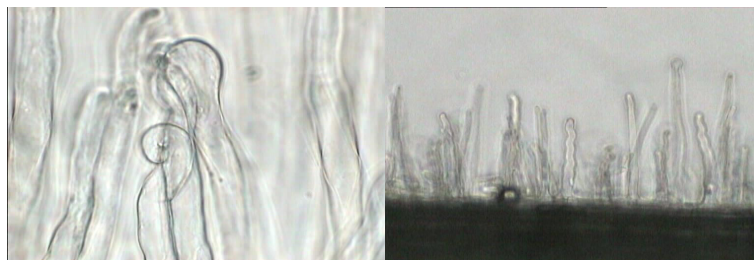


Abb. 5.8: Bei Tests mit Palmitinsäurederivat **70** wurde ein „shepard’s crook“ gefunden.

Bei Behensäurederivat **71** wurden keine Veränderungen beobachtet, allerdings war diese Verbindung schlecht löslich, so dass die angestrebte Konzentration von 10^{-4} M / Liter sehr

wahrscheinlich nicht erreicht wurde. Verbindung **73** zeigte nur vereinzelt Wellenformen und Keulen, die vermutlich auf Dimethylsulfoxid zurückzuführen sind.

Dazzo und *Hollingsworth*^[92] beschreiben die durch native NOD-Faktoren verursachten Veränderungen an den Wurzelhaaren von *Medicago sativa* als „branching“ bzw. bei *Trifolium repens* als irreguläre Verformungen („irregular distortions“), die von Palmitinsäurederivat **70** verursachten Veränderungen an den Wurzelhaaren von *Medicago sativa* aber als schraubenzieherartig („corkscrews“) bzw. bei *Trifolium repens* als keulenförmig („balloon tip swellings“). Die auch von uns in grosser Zahl gefundenen schraubenzieherartigen bzw. keulenförmigen Deformationen sind bei den in Bielefeld durchgeführten Wurzelhaartests wahrscheinlich auf den Zusatz von Dimethylsulfoxid zurückzuführen (**Abb. 5.6**). Dieser Zusatz war notwendig, um die längerkettigen Acylverbindungen für die Applikation auf die Wurzeln in Wasser zu lösen. Auch von anderen Substanzen, die wachstumsschädigend sind bzw. Zellgifte darstellen (*K. Niehaus*, mündliche Mitteilung), ist eine keulenartige Veränderung der Wurzelhaare bekannt. Abgesehen von den keulenartigen und schraubenzieherförmigen Deformationen konnten nur bei dem Caprinsäurederivat **69** vereinzelt „branching“-Ansätze (**Abb. 5.7**) und bei dem *N*-Palmitoylglucosamin **70** ein „shepard’s crook“ (**Abb. 5.8**) beobachtet werden. Das von den natürlichen NOD-Faktoren verursachte charakteristische „branching“ hingegen wurde, wie auch bei *Dazzo* und *Hollingsworth*, mit den synthetisierten Verbindungen so gut wie nicht beobachtet.

Die mit *Medicago sativa* gefundene Aktivität erscheint als zu gering, um bei *N*-Palmitoylglucosamin **70** von einer Minimalstruktur zu sprechen. Zur Absicherung der obigen Ergebnisse sind aber weitere Tests notwendig. Denkbar wäre z.B., die zu testenden Substanzen direkt in das Nährmedium einzubringen. Dies könnte vor dem Autoklavieren geschehen, wobei die Beständigkeit der Substanzen während des Autoklavierens noch sichergestellt werden müsste, oder nach dem Autoklavieren in der Abkühlphase vor dem Giessen des Nährmediums. Somit könnte auch bei wasserunlöslichen Substanzen auf den Einsatz weiterer Lösungsmittel verzichtet und Artefakte, wie z.B. durch die Verwendung von Dimethylsulfoxid, ausgeschlossen werden.

Darüberhinaus wären Untersuchungen mit anderen Testsystemen sinnvoll. Es könnte z.B. der Einfluss der zu testenden Substanzen auf Zellteilungen im Cortex („ccd’s“, „cortical cell divisions“) untersucht werden, wie sie auch von natürlichen NOD-Faktoren hervorgerufen werden. Falls Dimethylsulfoxid hierbei nicht aktiv ist, könnte sogar das obige Lösungsverfahren für wasserunlösliche Verbindungen übernommen werden.

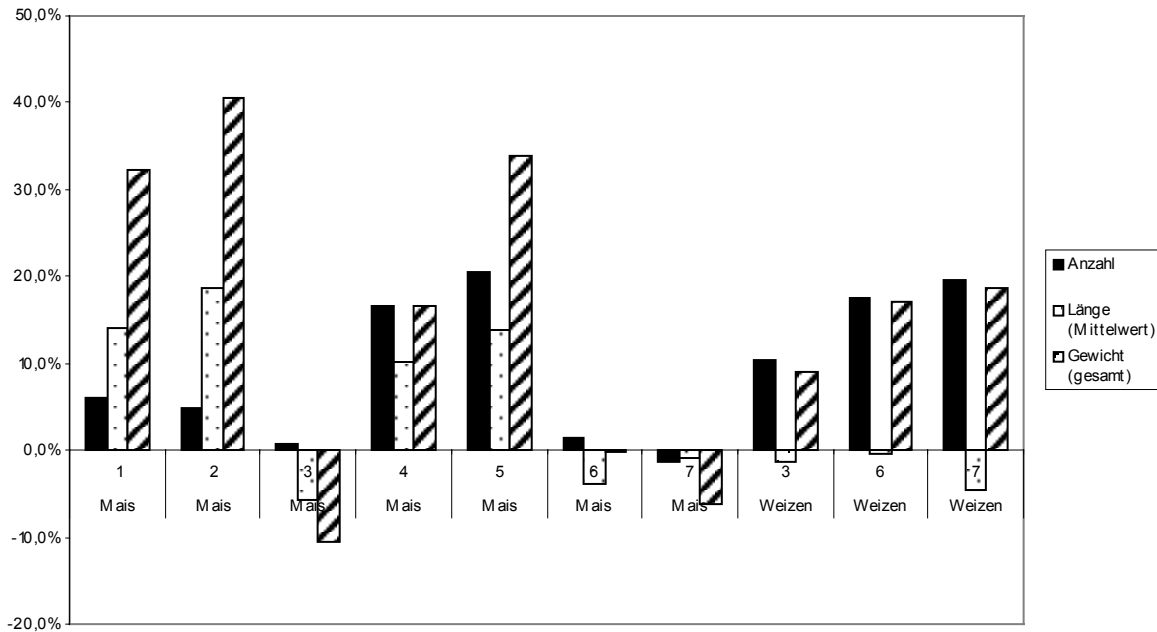


Abb. 5.10: Grafische Darstellung der maximal gefundenen Wirkung der Formulierungen (Tab. 5.1) auf die Anzahl der gekeimten Samen, die durchschnittliche Länge und das Gewicht von Mais bzw. Weizen nach einem Zeitraum von 14 Tagen verglichen mit den Blindproben.^[142]

Bei den Testergebnissen von Tab. 5.1 ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei Blindversuchen ohne die zu testenden Substanzen eine Schwankungsbreite von etwa $\pm 8\%$ auftritt. Da sich ferner bei Wiederholung der Testreihen z.T. unterschiedliche Werte ergaben, sind weitere Tests zur Absicherung der obigen Ergebnisse erforderlich.

5.2.3 Wirkung von Acylmonoglycosiden auf die T-Zell-Proliferation

Ein ganz anderes Gebiet, in dem Glycolipide eine Rolle spielen, ist die Immunologie. Die meisten T-Zellen des Immunsystems erkennen prozessierte Antigene von Krankheitserregern in Form von kurzen Peptiden, die von MHC-Molekülen präsentiert werden. Wie in jüngerer Zeit gezeigt werden konnte, werden mehrere T-Zell-Unterklassen aber auch von Lipiden, Glycolipiden und phosphorylierten Verbindungen stimuliert. Für die Präsentation dieser nichtpeptidischen Antigene ist die CD1-Glycoproteinfamilie verantwortlich. Dabei werden Glycolipide mit ihrem Lipidanteil in der hydrophoben Spalte des CD1-Glycoproteins verankert und den T-Zellen präsentiert. Die bisher gefundenen aktiven Glycolipidantigene weisen Mycolsäure oder verwandte Strukturen mit zwei Alkylketten als Lipidanteil auf. CD1-Moleküle wurden mittlerweile auf vielen Antigen-präsentierenden Zellen nachgewiesen.^[143,144]

Untersuchungen der T-Zell-Proliferation wurden von *Maxence Salomon*^[145] im Arbeitskreis von *Gerd Pluschke*, Schweizerisches Tropeninstitut, Basel, vorgenommen. Hierfür wurden die Glycolipide **68** – **70** und **73** – **75** in hitzebehandeltem Humanserum gelöst. Als positive Blindprobe wurde Isopentenylpyrophosphat (IPP) eingesetzt, die negative Blindprobe wurde ohne Antigen durchgeführt.

Die untersuchten Acylmonoglycoside waren in allen durchgeführten Tests negativ.^[145] Eine Möglichkeit für die fehlende Aktivität wäre eine inkorrekte Präsentation der untersuchten Glycolipide aufgrund der verwendeten Fettsäuren, die im Gegensatz zu den gefundenen Mycolsäurederivaten nur eine Alkylkette aufweisen. Möglicherweise ist die fehlende Aktivität aber auch auf die Verwendung von Glucosamin als polarer Kopfgruppe oder eine geringe Bioverfügbarkeit der schlecht löslichen Verbindungen zurückzuführen.

5.3 Syntheseplanung zum Aufbau von Lipochitooligosacchariden

Um weitere Untersuchungen mit natürlichen oder modifizierten Strukturen durchzuführen, sollten auch Lipochitooligosaccharide (LCOs) synthetisiert werden. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war eine universelle Synthese zum Aufbau von Lipochitooligosacchariden mit mehreren Modifikationsmöglichkeiten zu entwickeln, um in möglichst wenigen Stufen zu natürlichen NOD-Faktoren mit verschiedenen Substituenten zu gelangen und darüber hinaus auch einen einfachen Zugang zu Analoga zu bieten.

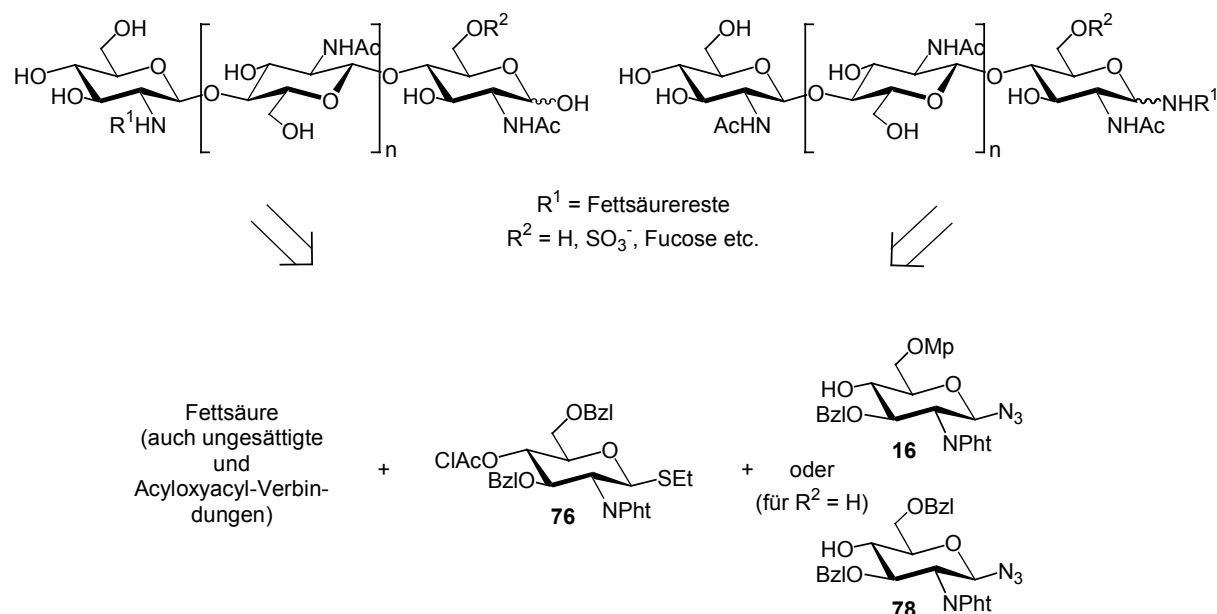


Abb. 5.11: Retrosynthetische Überlegungen für NOD-Faktoren und Analoga.

Dabei sollte von Bausteinen ausgegangen werden, die sich für die Synthese von *N*-Glycanen bewährt haben und leicht zugänglich sind. Für das reduzierende Ende stehen dabei die beiden

Azide **16** und **78** zur Verfügung. Die Omp-Schutzgruppe von Verbindung **16** erlaubt dabei die spätere Einführung z.B. eines Sulfat- oder Fucosylrestes. Falls dies nicht erwünscht ist, spart die einfacher zugängliche Verbindung **78** den Entschützungs Schritt der Omp-Schutzgruppe. Zur Kettenverlängerung soll das Thioglucosid **76** eingesetzt werden, die Oligomerenlänge ist dadurch je nach Synthesziel variabel einstellbar. Die Azidschutzgruppe am reduzierenden Ende ermöglicht darüber hinaus die Einführung weiterer Substituenten für die Darstellung von Analoga.

5.3.1 Darstellung natürlicher NOD-Faktoren

Als Zielmolekül wurde ein tetramerer NOD-Faktor ohne Sulfatgruppe in Position 6 am anomeren Ende gewählt. Dazu wurde zunächst Verbindung **78** analog der Darstellung von Thioglucosid **18** aus Verbindung **77** in einer Ausbeute von 91 % dargestellt.

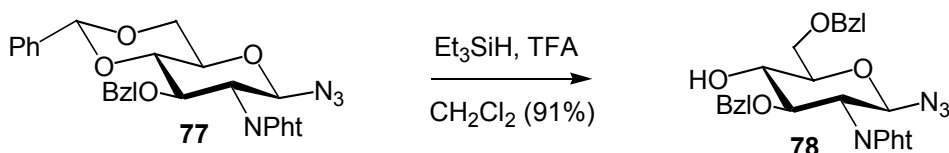


Abb. 5.12: Reduktive Acetalöffnung von Verbindung **77**.

Baustein **76** konnte mit Verbindung **78** unter Aktivierung durch *N*-Iodsuccinimid und Trifluormethansulfonsäure in Dichlormethan gekoppelt und anschließend mit Kaliumcarbonat schonend entschützt werden, wobei das Chitobiosylazid **30** erhalten wurde.

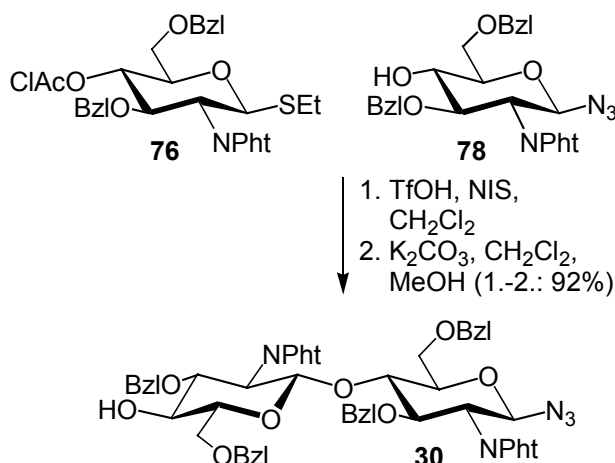


Abb. 5.13: Kupplung des Thioglucosids **76** mit Akzeptor **78**.

Das Ethylthioglucosid **76** besitzt gegenüber der Verwendung eines Trichloracetimidats oder eines Fluorids^[96] als Donor den Vorteil, dass die Darstellung des Thioglucosids weniger Stufen erfordert, Thioglucoside außerdem stabiler sind als Imidate und bei Raumtemperatur gelagert werden können. Die Ausbeute der Thioglucosidkupplung und der anschließenden

Entschützung übertraf sogar die Ausbeute, die mit dem entsprechenden Fluorid über beide Stufen erhalten wurde.^[96]

Das Chitobiosylazid **30** wurde mit dem Donor **76** unter den gleichen Glycosylierungsbedingungen verlängert und zu dem Trisaccharid **79** entschützt. Durch wiederholtes Glycosylieren lassen sich so sehr leicht Chitooligomere mit variabler Länge ausgehend von den beiden Grundbausteinen herstellen.

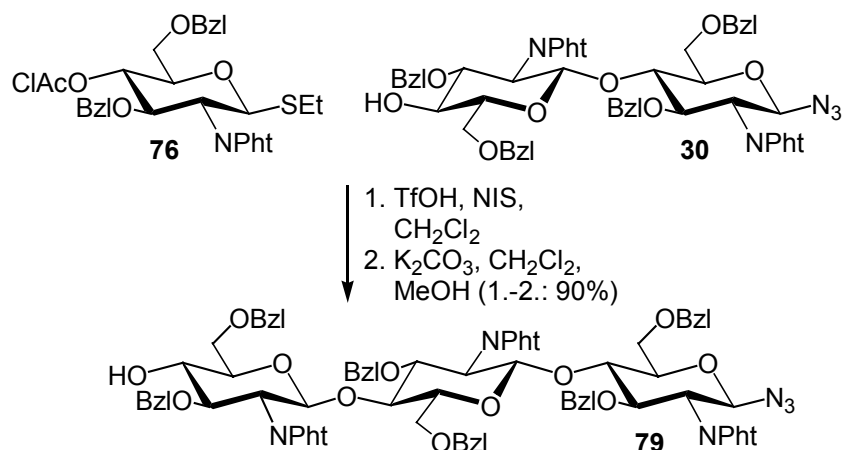


Abb. 5.14: Durch die sukzessive Kupplung von Thioglucosiden an die Akzeptorverbindungen lassen sich Chitooligomere mit variabler Länge darstellen.

Da eine tetramere Verbindung dargestellt werden sollte, wurde an dieser Stelle das Trisaccharid **79** in einer dreistufigen Reaktionsfolge zur Acetamidoverbindung **81** umgewandelt.

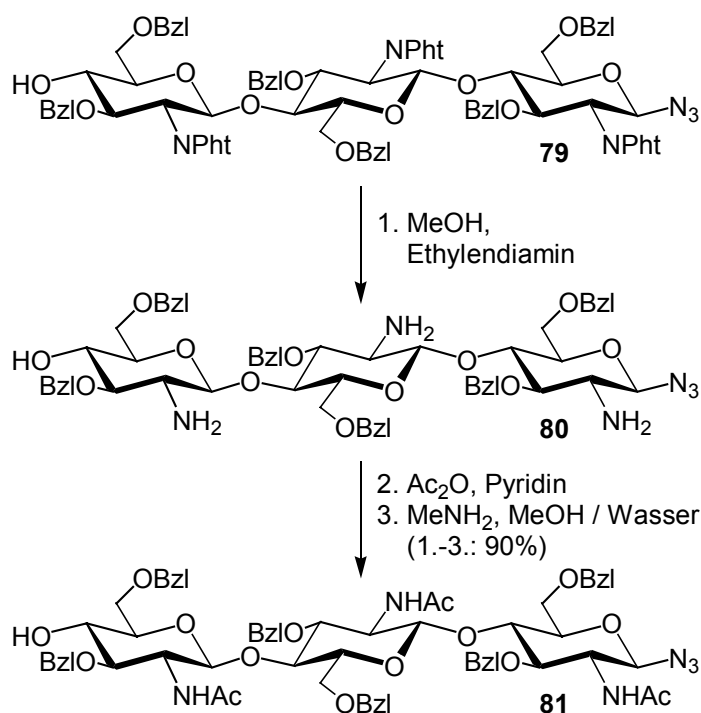


Abb. 5.15: Überführen der Phthalimidoverbindung **79** in die Acetamidoverbindung **81**.

Zunächst wurden die Phthalimidoschutzgruppen mit Ethylendiamin in Methanol vollständig entfernt. Hierbei bot die Verwendung von Methanol gegenüber dem sonst üblichen *n*-Butanol den Vorteil, dass Dünnschichtchromatographie direkt mit der Reaktionslösung betrieben werden und das Einengen rasch bei Raumtemperatur erfolgen konnte. Im anschließenden Schritt wurde peracetyliert, und anschließend die *O*-Acetylgruppe wieder entfernt.

Die Glycosylierung des Trisaccharids **81** zum Tetrasaccharid **83** wurde zunächst unter Verwendung des Thioglucosids **76** mit *N*-Iodsuccinimid und Trifluormethansulfonsäure durchgeführt. Dabei trat jedoch starke Zersetzung auf, so dass für diese Glycosylierung das Fluorid **82** aus dem Thioglucosid **76** hergestellt^[96] und unter Aktivierung durch Bortrifluorid-Etherat mit dem Trisaccharid **81** zu dem Tetramer **83** gekoppelt wurde. Das Tetramer **83** stellt durch die selektiv entschützbare Phthalimido- bzw. Azidschutzgruppe eine universelle Vorstufe für NOD-Faktoren und Analoga dar.

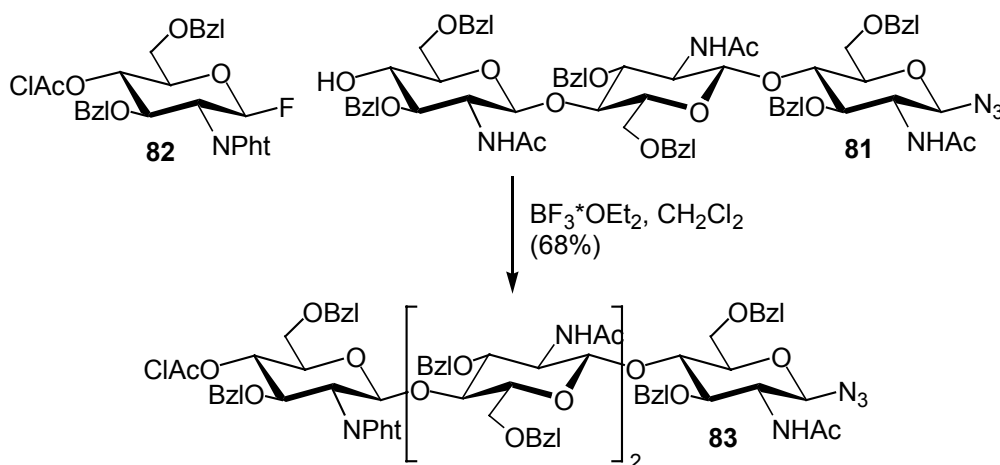


Abb. 5.16: Tetrasaccharid **83** als Vorstufe für NOD-Faktoren.

Für die Darstellung von NOD-Faktoren wurden in Verbindung **83** in einem Schritt die Phthalimido- und die sehr labile Chloracetylschutzgruppe entfernt.

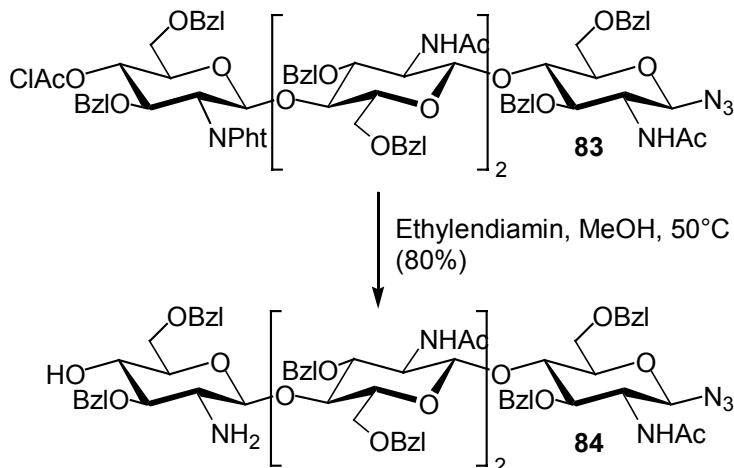


Abb. 5.17: Entschützung zu dem Amin **84**.

Bei der Reinigung des Amins **84** über Kieselgel wurde nur eine Ausbeute von ca. 60 % erzielt. Die alternative Reinigung über RP18-SepPak-Kartuschen führte bei dieser polaren Verbindung zu besseren Ausbeuten von 80 %.

Über die freie Aminofunktion können Fettsäurereste eingeführt werden. Das für Verbindung **90** benötigte Palmitinsäurechlorid ist käuflich erhältlich, für die parallel durchgeführte Synthese der Acyloxyacylverbindung **91** musste hingegen die (R,S)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecansäure **89** zunächst dargestellt werden. Um sowohl die (R)- wie auch die (S)-Verbindung enantiomerenrein zu erhalten, sei auf die Synthese von *B. Jakob*, *G. Voss* und *H. Gerlach*^[146] verwiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch absichtlich das Enantiomerengemisch synthetisiert. Dazu wurde Bromessigsäurebenzylester **85** mit Tetradecanal **86** und Zinkspänen unter Reformatsky-Bedingungen^[147] umgesetzt. Der so erhaltene (R,S)-3-Hydroxyhexadecansäurebenzylester **87** wurde mit Palmitinsäurechlorid, Pyridin und DMAP in den (R,S)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecansäurebenzylester **88** überführt. Nach Entfernung des Benzylesters durch Hydrieren über Palladium/Kohle (10 %) wurde (R,S)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecansäure **89** erhalten.

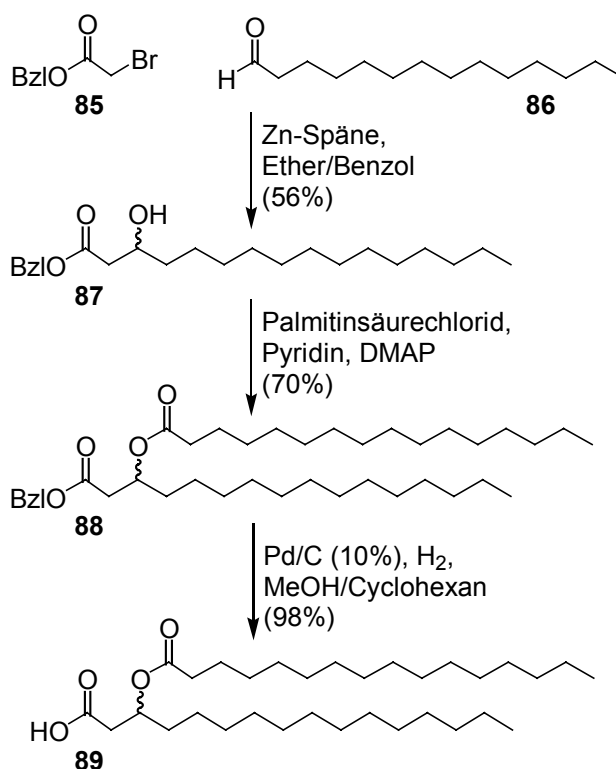


Abb. 5.18: Darstellung der Acyloxyacylverbindung **89**.

Palmitinsäurechlorid wie auch die (R,S)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecansäure **89** wurden an das Tetrasaccharidamin **84** gekoppelt.

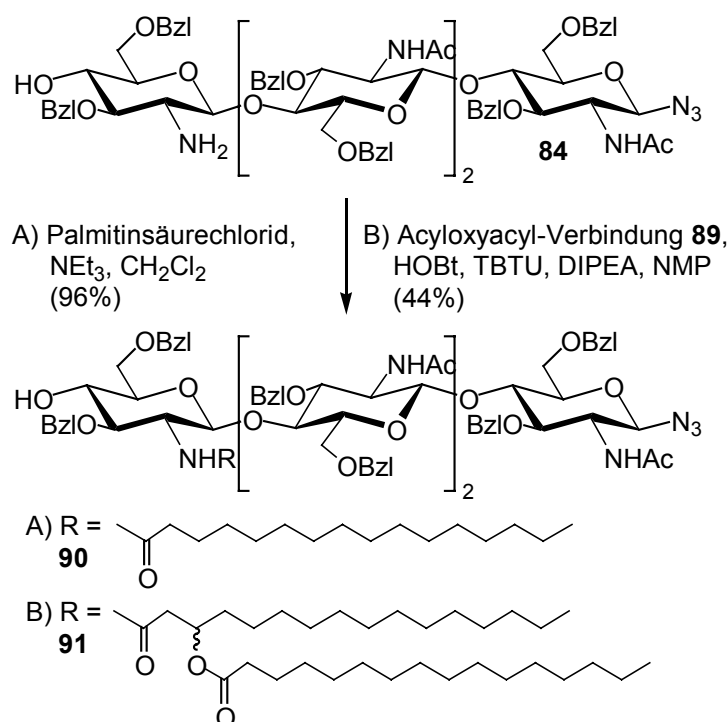


Abb. 5.19: Acylierung von Verbindung **84** mit Fettsäuren.

In der nachfolgenden Reaktion wurde das Azid zum Amin reduziert und das Amin in das Halbacetal (**92** und **93**) überführt.

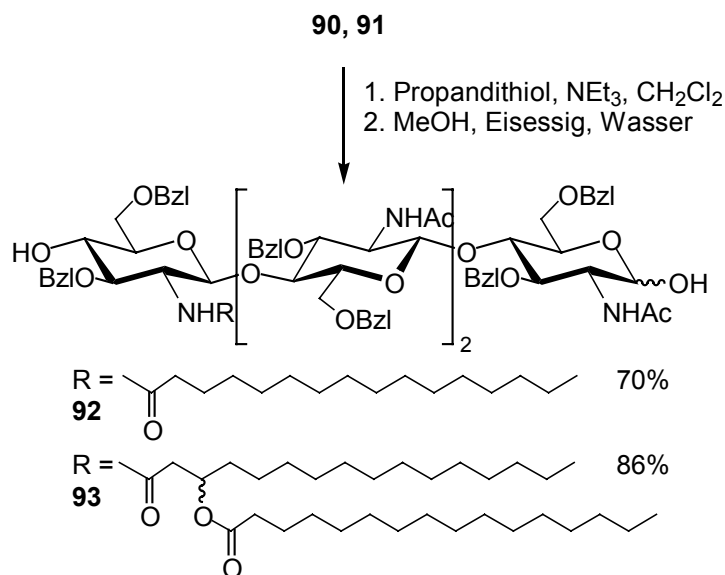


Abb. 5.20: Überführung der Azide **90** und **91** zu den Hydroxyverbindungen **92** und **93**.

Die anschließende Hydrierung zu den Verbindungen **94** bzw. **95** verlief schleppend und mit schlechter Ausbeute unter Bildung von Nebenprodukten. Dies ist vermutlich auf den Palladiumoxidhydratkatalysator zurückzuführen, da mit dieser Charge auch andere Mitarbeiter bei Hydrierungen ihrer Substanzen schlechte Ergebnisse mit z.T. nicht erklärbaren Nebenprodukten erhielten. Das Reaktionsprodukt ist außerdem sehr schlecht löslich, so dass

bei zukünftigen Hydrierungen eine geringere Menge Substanz in wesentlich mehr Methanol als Lösungsmittel verwendet werden sollte. Die erhaltenen Endverbindungen **94** und **95** sind in Wasser, Acetonitril, Methanol, Chloroform, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Gemischen davon nicht oder nur extrem schlecht löslich. Lösen lassen sie sich hingegen in NMP oder Gemischen aus *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung.

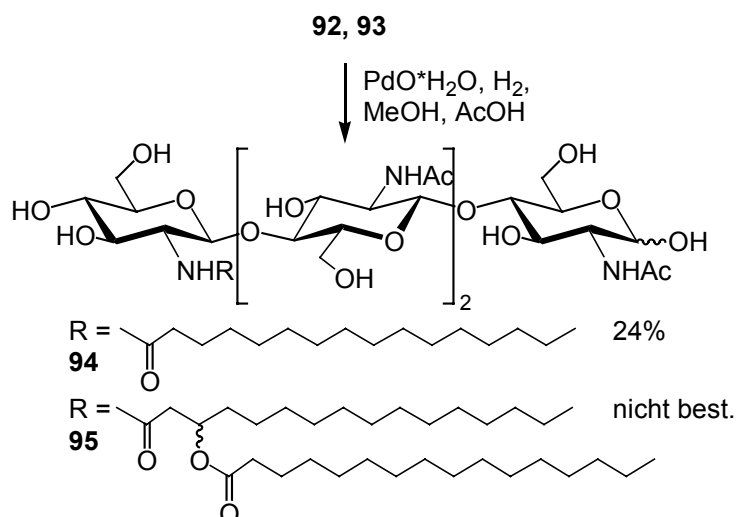


Abb. 5.21: Darstellung der Zielverbindungen **94** und **95**.

Bei der Hydrierung von Verbindung **93** wurde darüber hinaus zwar das gewünschte Produkt **95** erhalten, aber auch geringe Mengen von Verbindung **94**, die vermutlich über eine Eliminierung der Estergruppierung aus Produkt **95** entsteht. Es wurde auf diesem Wege deshalb nicht weiter gearbeitet, sondern der Zugang über einen alternativen Weg gesucht.

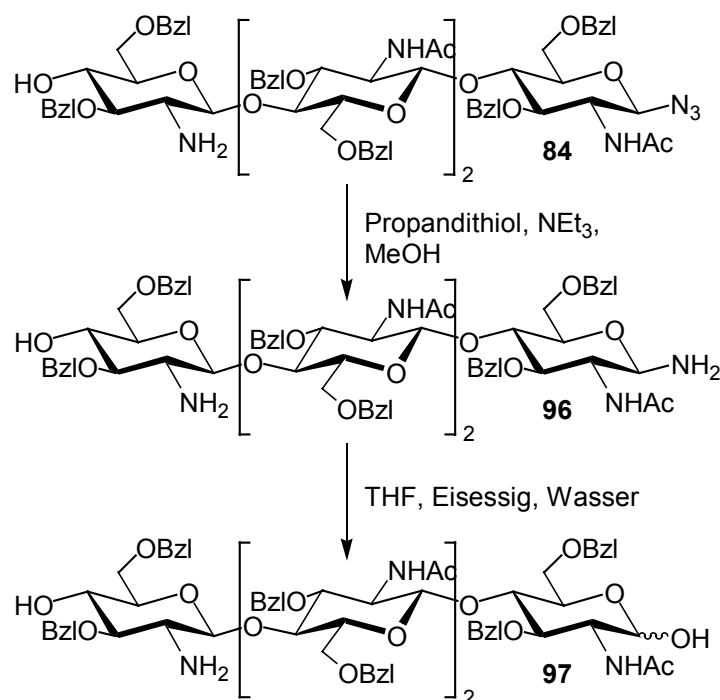


Abb. 5.22: Überführung der Azidoverbindung **84** in die Hydroxylverbindung **97**.

Da aufgrund der abschließenden Hydrierung keine Verbindungen mit ungesättigten Fettsäureresten dargestellt werden können, wurde die Hydrierung vor der Kupplung der Fettsäure durchgeführt. Dazu musste zunächst bei dem Amin **84** die Azidfunktion in eine Hydroxylgruppe überführt werden. Die Reduktion des Azids zum Amin verlief mit Propandithiol problemlos. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde die Verbindung **96** ohne weitere Reinigung in einem Gemisch aus THF, Eisessig und Wasser gelöst und 30 Minuten gerührt.

Dabei entstand zwar das gewünschte Halbacetal **97**, jedoch war das Propandithiol bei der Umsetzung der Hauptmenge an **84** im Gegensatz zu den vorausgegangenen kleinen Testversuchen offensichtlich beim Trocknen nicht vollständig entfernt worden und führte zu einer irreversiblen Dithianbildung unter Ringöffnung am reduzierenden Ende. Dieses Nebenprodukt **98** ließ sich säulenchromatographisch nicht vollständig abtrennen, eine Ausbeutebestimmung war dadurch nicht möglich. Es wurden verschiedene Dithianentschützungen versucht, diese blieben jedoch entweder erfolglos oder führten zu Zersetzung. Um die Dithianbildung zu vermeiden, muss das Glycosylamin nach der Reduktion mit Propandithiol isoliert und gereinigt oder eine andere Azidreduktion (z.B. Hydrierung) erwogen werden.

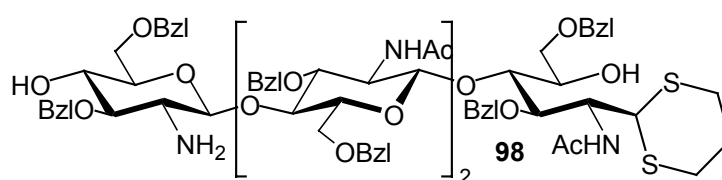


Abb. 5.23: Dithian **98** wurde als Nebenprodukt erhalten.

Verbindung **97** wurde trotz der Verunreinigung mit dem Dithian **98** hydriert. Dies gelang in 73 % Ausbeute nach Gelfiltration. Es ließ sich keine Dithianverbindung mehr nachweisen.

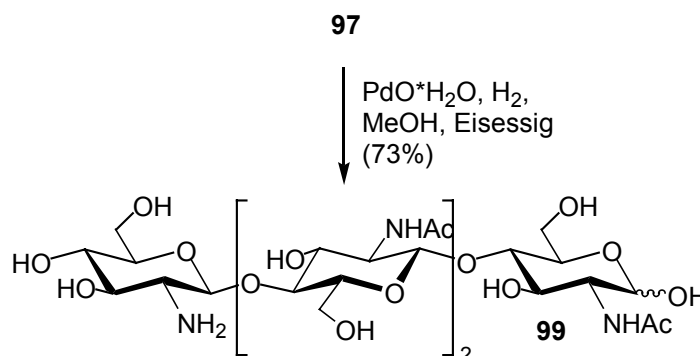


Abb. 5.24: Hydrierung von Verbindung **97**.

Das Amin **99** war damit zur Kupplung verschiedenster, auch ungesättigter oder veresterter, Fettsäuren vorbereitet. Für die Kupplung wurden die jeweiligen *N*-Hydroxysuccinimidester der entsprechenden Fettsäuren eingesetzt.

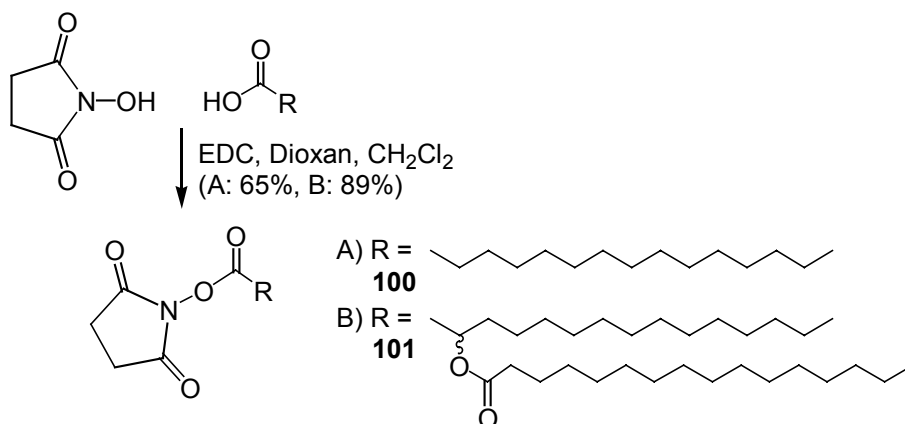


Abb. 5.25: Darstellung der aktivierten Fettsäuren **100** und **101**.

Die säulenchromatographisch gereinigten Aktivester **100** und **101** wurden mit dem Amin **99** in NMP gekoppelt. Laut Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie verlief die Umsetzung glatt und in guter Ausbeute.

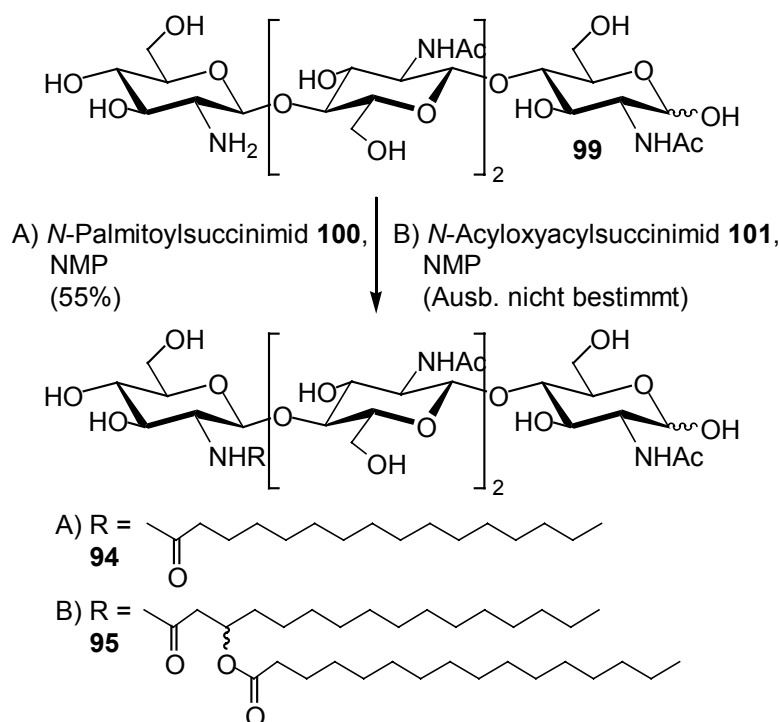


Abb. 5.26: Die Kupplung der aktivierten Fettsäuren erfolgte ohne Zugabe weiterer Substanzen; dies erleichterte die Reinigung der schlecht löslichen Zielverbindungen **94** und **95**.

Problematisch gestaltete sich jedoch wiederum die Reinigung, da sich die Produkte **94** und **95** in Methanol nur in einer Konzentration von weniger als 1.5 mg/ml lösen und dementsprechend in mehreren kleinen Portionen über die verwendete Sephadex-LH20

Gelsäule gereinigt werden mussten. Abhilfe könnte die Verwendung von NMP bringen, da die Produkte in NMP löslich sind und NMP als mobile Phase für Sephadex-Gelsäulen beschrieben ist.^[148] Auch ist eine Reinigung über Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung denkbar, könnte aber aufgrund der vielen polaren Gruppen der Verbindungen **94** und **95** zu hohen Verlusten führen. Bei einer Wiederholung der Synthesen sollten diese Möglichkeiten unbedingt verfolgt werden, um die bei der Reaktion in NMP in großen Mengen leicht erhältlichen Verbindungen **94** und **95** rasch und effizient reinigen zu können.

Ein weiteres Problem stellt die Aufnahme von NMR-Spektren dar. Mit D₂O, MeOD, CDCl₃ oder Gemischen davon konnte keine zufriedenstellende Löslichkeit erreicht werden. Auch in [D₆]-Dimethylsulfoxid sind die Substanzen nur in sehr geringer Menge (deutlich weniger als 2 mg/ml) löslich, so dass nur das Palmitinsäurederivat **94** gemessen wurde und die Qualität der Spektren aufgrund der niedrigen Konzentration der Probe gering ist. Dennoch konnte Verbindung **94** aus den gegebenen Spektren zugeordnet werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung von deuteriertem NMP für NMR-spektroskopische Untersuchungen, das käuflich erhältlich ist.

Die Zielverbindungen **94** und **95** stehen somit für weitere Untersuchungen, speziell für Untersuchungen zur Rhizobien-Leguminosen-Symbiose, bereit.

5.3.2 Darstellung von Analoga

Der gewählte Syntheseweg und die Verwendung des Azids **78** bieten den Vorteil, über die maskierte Aminfunktion der Azidschutzgruppe weitere Substituenten an Position 1 des reduzierenden Zuckers einzuführen. Dazu wurde zunächst die phthalimidogeschützte und chloracetylierte Verbindung **83** entschützt und in Verbindung **102** überführt.

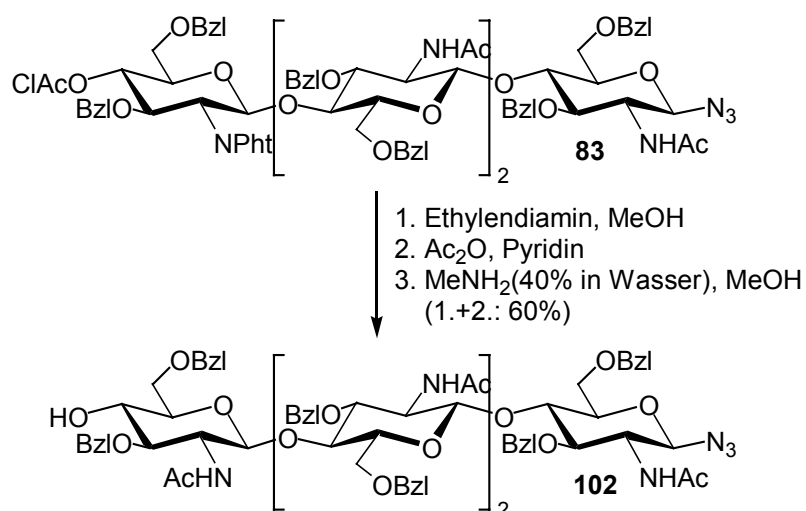


Abb. 5.27: Darstellung der vollständig *N*-acetylierten Verbindung **102**.

Die geschützten Verbindungen **103** und **104** wurden durch Reduktion von **102** und anschließende Kupplung von Palmitinsäure bzw. der Acyloxyacylverbindung **89** dargestellt.

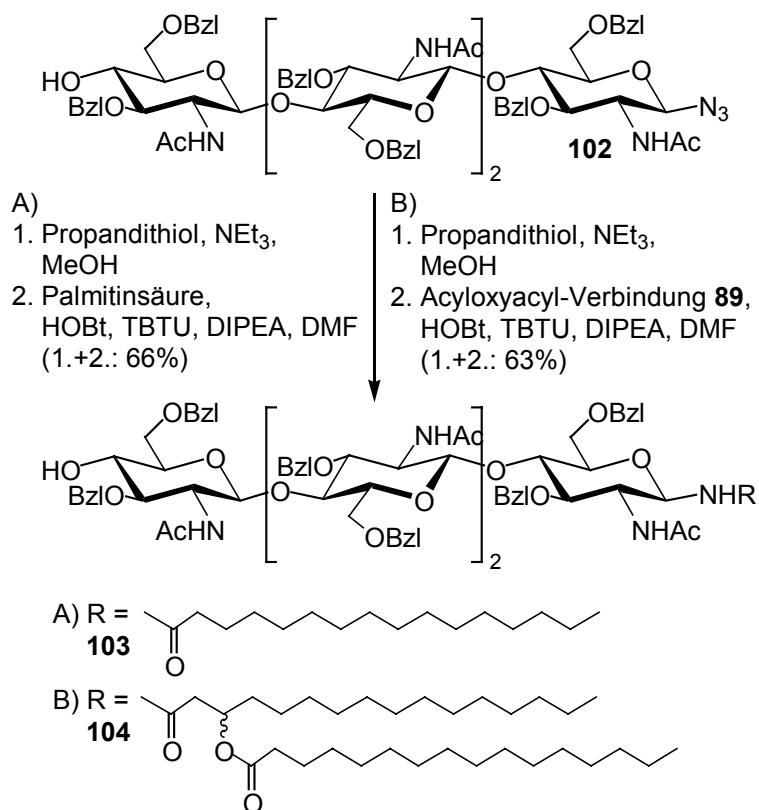


Abb. 5.28: Darstellung von NOD-Faktoranaloga, bei denen der Lipidteil am anomeren Zentrum des reduzierenden Zuckers verknüpft ist.

Abschließend wurden die benzylgeschützten Verbindungen **103** und **104** hydriert.

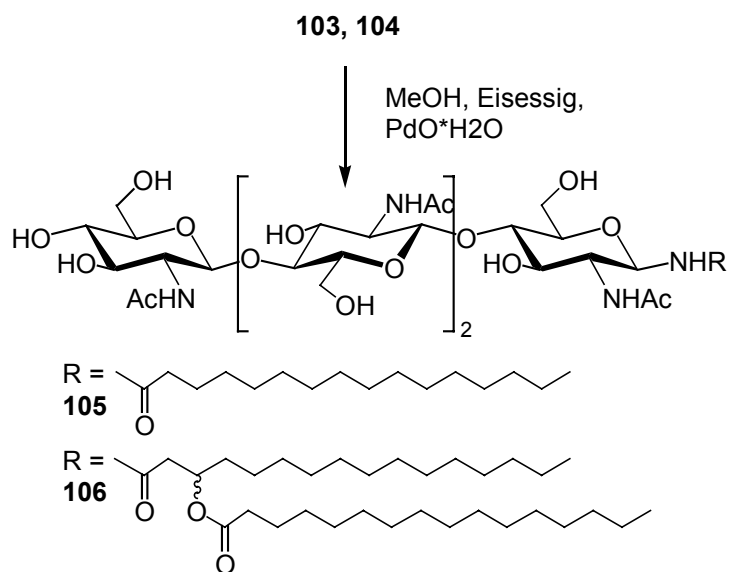


Abb. 5.29: Abschließende Hydrierung zu den synthetischen NOD-Faktoranaloga **105** und **106**.

Aufgrund der Beobachtung, dass bei Hydrierungen mit Palladiumoxidhydrat unter Verwendung von Eisessig die Esterbindung der Acyloxyacylverbindungen, wenn auch nur in geringem Umfang, angegriffen wird, wurden Versuche zur schonenderen Hydrierung unternommen. Der Versuch, gänzlich auf Essigsäure zu verzichten, brachte keinen Erfolg, aber bei Zugabe einer geringen Menge an Essigsäure (weniger als 20 % der normalerweise verwendeten Menge) wurde das gewünschte Produkt erhalten. Laut massenspektrometrischer Untersuchung konnte kein Verlust der Estergruppe nachgewiesen werden. Trotz einer geringfügig besseren Löslichkeit der Verbindungen **105** und **106** gegenüber den Verbindungen **94** und **95** gestaltete sich auch hier die Reinigung aufwendig.

Zwar können bei diesem Syntheseweg keine ungesättigten Aclyreste verwendet werden, jedoch könnte dieses Problem leicht durch die Wahl eines geeigneten Spacers umgangen werden. Nach der Kupplung und anschließenden Hydrierung der Verbindung könnten an eine Aminofunktion z.B. eines Aminoheptanoylspacers ungesättigte Verbindungen gekoppelt werden.

Über den gezeigten Syntheseweg wurden somit die vier Lipochitooligosaccharide **94**, **95**, **105** und **106** hergestellt, die für weitere Untersuchungen bereit stehen. Die modular aufgebaute Synthesestrategie bietet darüber hinaus einen leichten Zugang zu zahlreichen weiteren Verbindungen.

6. Zusammenfassung

Zucker spielen eine entscheidende Rolle in vielen Bereichen des Lebens. Zur Untersuchung ihrer mannigfaltigen biologischen Eigenschaften sind definierte Verbindungen notwendig.

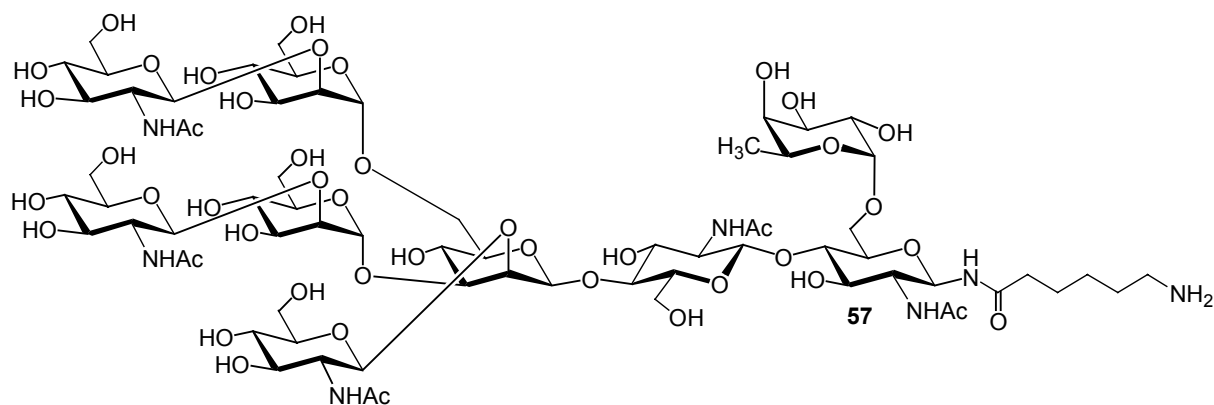
Diese Arbeit sollte durch chemo-enzymatische Synthese des von *P. Stanley* isolierten Lec14-*N*-Glycans **58**, das eine β -1,2-Verknüpfung von *N*-Acetylglucosamin mit dem β -Mannosid des Core-Trisaccharids aufweist, den Strukturvorschlag verifizieren und Neoglycoproteine mit dieser Oligosaccharidstruktur für biologische Studien bereitstellen.

Zum Aufbau des dazu notwendigen Core-Trisaccharids **39** konnte die Synthese des *p*-Methoxyphenylbausteins **16** deutlich verbessert werden. Auch konnten bei der reduktiven Acetalöffnung von Verbindung **17**, die vielseitig einsetzbar ist, Verbesserungen eingeführt werden.

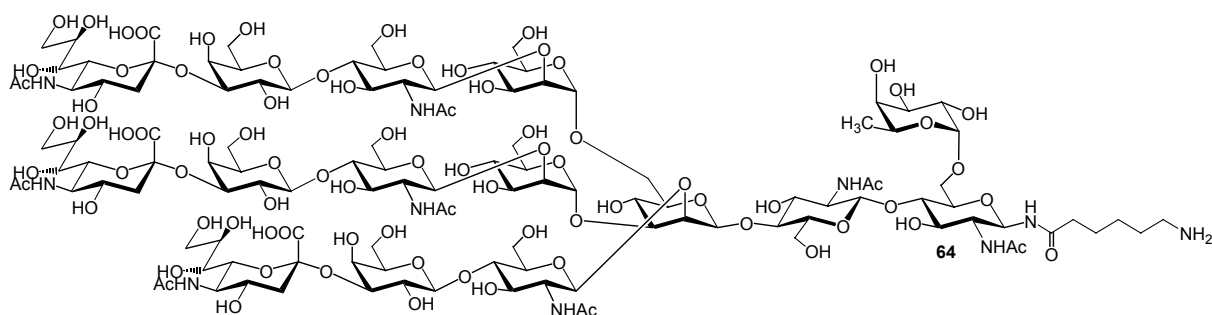
Im Rahmen der Core-Trisaccharidsynthese wurden Versuche zur direkten β -selektiven Mannosylierung durchgeführt. Die mit den Donoren **24** und **26** durchgeführten Glycosylierungen mit Cyclohexanol als Akzeptor verliefen β -selektiv und mit sehr hohen Ausbeuten. Mit Chitobiosylazid **30** als Akzeptor wurden Trisaccharide erhalten, allerdings mit geringen Ausbeuten und schlecht abtrennbaren Verunreinigungen. Das Core-Trisaccharid **39** wurde daher durch Inversion aus der Glucoverbindung **38** hergestellt.

An Pentasaccharid **41** erfolgte die GlcNAc- β -1,2-Anbindung an die Mannose des Core-Trisaccharids unter Verwendung des Donors **42**. Verschiedene Testreihen führten zum Auffinden eines schmalen Temperaturfensters und zu optimierten Reaktionsbedingungen für die Darstellung des Hexasaccharids **44**.

Durch Glycosylierung mit dem Disaccharid **40**, Donor **51** und anschließender Entschützung wurde das Lec14-Nonasaccharid **54** erhalten. Dieses wurde nach der Kupplung mit *Z*-Aminohexansäure **55** durch Hydrieren in Verbindung **57** überführt. Verbindung **57** stützte durch Vergleich mit den NMR-Daten von Verbindung **58** den Strukturvorschlag von *P. Stanley* und stellte das Substrat für enzymatische Synthesen dar.



Bei der enzymatischen Galactosylierung wurde jeweils nur ein Äquivalent UDP-Galactose eingesetzt. Dadurch konnten nacheinander die einfach, zweifach und dreifach galactosylierten Verbindungen **61**, **62** und **63** erhalten werden. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen wurde eine Selektivität der Galactosyltransferase für den α -1,3-Arm, dann den α -1,6-Arm und schließlich den β -1,2-Arm gefunden. Auch die Sialylierung aller drei Arme konnte massenspektroskopisch mit Verbindung **64** belegt werden. Da bei Verbindung **57** die Galactosylierung und die anschließende Sialylierung unerwarteterweise an sämtlichen Verzweigungen möglich ist, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Strukturmotiv auch bei *N*-Glycanen der betreffenden CHO-Zellen gefunden werden kann.



Die dreifach galactosylierte Verbindung **63** wurde für die Darstellung des Neoglycoproteins **66** über das Isothiocyanat **65** an Rinderserumalbumin (BSA) gebunden. Somit steht erstmals ein Neoglycoprotein mit dem Lec14-Oligosaccharid für biologische Untersuchungen bereit.

Im Pflanzenreich sind für eine erfolgreiche Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien die von den Bakterien sekretierten NOD-Faktoren essentiell. Da *Dazzo* und *Hollingsworth* *N*-Palmitoylglucosamin als Minimalstruktur für NOD-Faktoren ansehen, wurden *N*-Palmitoylglucosamin **70** und andere Monosaccharidderivate für biologische Untersuchungen bereitgestellt.

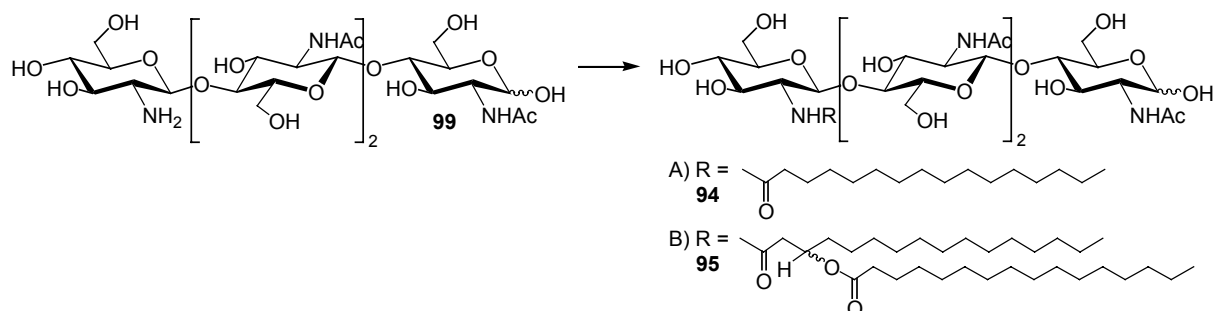
Bei Untersuchungen an *Medicago sativa* (Luzerne) wurde in Zusammenarbeit mit Herrn *K. Niehaus* in Bielefeld jedoch nur eine geringe Aktivität der getesteten Verbindungen gefunden, so dass diese nicht als Minimalstrukturen angesehen werden sollten.

Der Einfluss der Monosaccharidderivate auf die Keimfähigkeit und das Wachstum von Weizen und Mais wurde von Dr. *G. Kretzschmar* in Frankfurt untersucht. Die z.T. sehr guten Ergebnisse müssen aber aufgrund der hohen Schwankungen bei den biologischen Untersuchungen durch weitere Messreihen abgesichert werden.

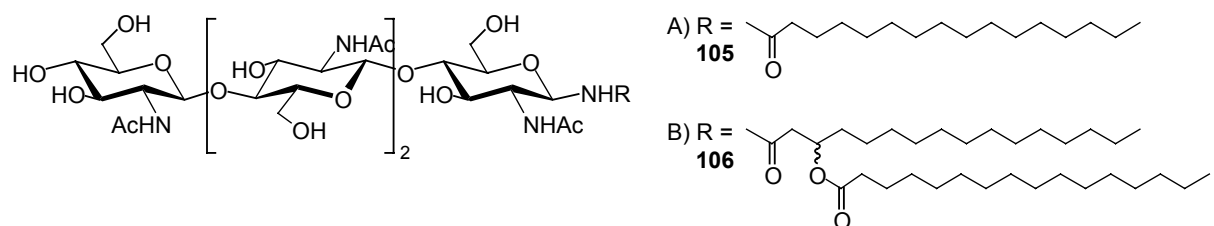
Für weitere Untersuchungen wurde eine Synthese von natürlichen NOD-Faktoren und Analoga etabliert. Dabei wurde auf die funktionalisierten Monosaccharidbausteine **76** und **78** zurückgegriffen, die in großen Mengen einfach zugänglich sind. Die Aminogruppe des Tetrasaccharids **84** ist für die Kupplung mit Acylresten funktionalisiert.

Nach der Kupplung von Acylresten an Verbindung **84** und den anschließenden Entschützungsschritten wurden jedoch Nebenprodukte gefunden, und die Reinigung gestaltete sich aufgrund der sehr geringen Löslichkeit der Verbindungen **94** und **95** sehr schwierig.

Ausgehend von Verbindung **84** wurde die freie Aminoverbindung **99** hergestellt. Nach der Kupplung der Acylreste über *N*-Hydrosuccinimidester wurden die Zielverbindungen **94** und **95** erhalten.



Der Baustein **83** eignete sich für die einfache Darstellung von Analoga. Die Azidofunktion ermöglichte nach der Reduktion zu einem Amin die Anknüpfung von Carbonsäuren am reduzierenden Ende. Die folgende Hydrierung lieferte die Analoga **105** bzw. **106**.



Mit den Verbindungen **94**, **95**, **105** und **106** stehen vier weitere Strukturen bereit, die auf ihre biologischen Aktivitäten bezüglich der Symbiose von Leguminosen und Rhizobien untersucht werden können.

Die vorgestellte Methode bietet einen leichten Zugang zu NOD-Faktoren und Analoga, deren Einsatz in biologischen Studien weitere Einblicke auf dem Gebiet der NOD-Faktoren und der beteiligten Signalwege bringen soll.

7. Summary

Carbohydrates play a key role in many aspects of life. Well defined carbohydrates are needed to investigate their numerous biological properties.

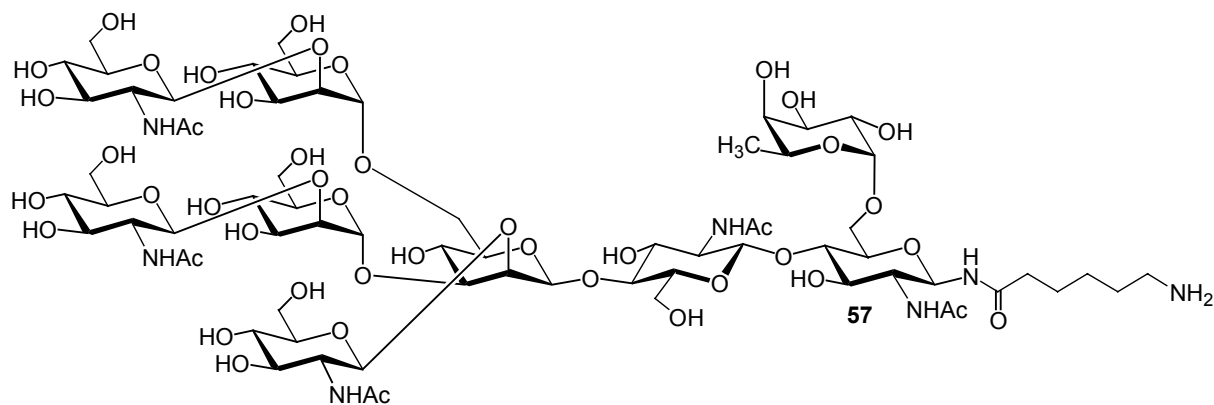
The aim of this work was to synthesize a derivative of the Lec14-*N*-glycan **58**, which has been isolated by *P. Stanley*. This *N*-glycan shows a β -1,2-linkage of *N*-acetylglucosamine to the β -mannoside of the core-trisaccharide. The synthetic compound should verify the structural assignments for **58** and allow the preparation of neoglycoproteins for biological studies.

The synthesis of the *p*-methoxyphenyl compound **16**, which is needed for the synthesis of the core-trisaccharide **39**, could be significantly optimized. Additionally, the reductive opening of **17** was improved.

To shorten the synthesis of the core-trisaccharide direct β -mannosylation was investigated. Mannosylation with the donors **24** and **26** and cyclohexanol as an acceptor were β -selective and afforded the desired product in high yields. When disaccharide **30** was used as an acceptor, only mixtures of trisaccharides were obtained in low yields. Therefore, trisaccharide **39** was synthesized by an inversion strategy using the gluco-configured compound **38**.

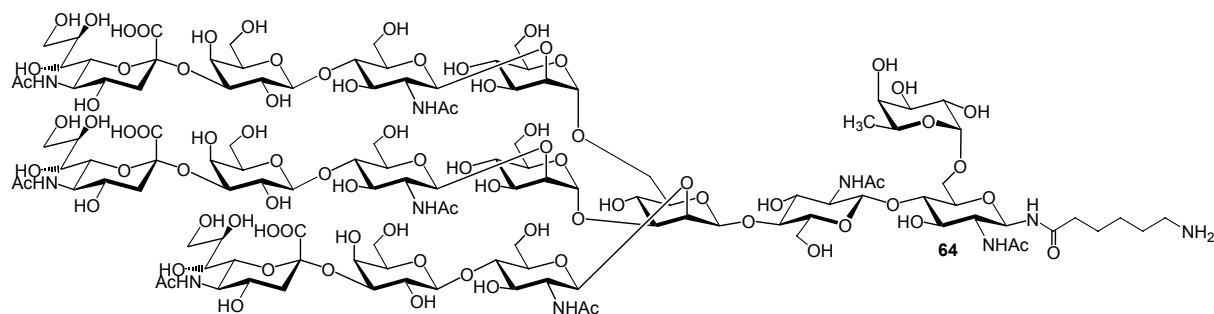
The pentasaccharide **41** could be coupled with donor **42** to obtain the hexasaccharide **44** with the desired GlcNAc- β -1,2-linkage. A small temperature range and optimized conditions were found to be crucial for the synthesis of compound **44**.

Glycosylation of disaccharide **40** with donor **51** and subsequent deprotection yielded the Lec14 nonasaccharide **54**. This compound was coupled to *Z*-aminohexanoic acid **55** and the following catalytic hydrogenation furnished compound **57**. Comparison of the NMR-spectra of compound **57** and isolated Lec14 **58** allowed the verification of the structural assignments made by *P. Stanley*.



For the enzymatic galactosylation of aminohexanoyl-Lec14 **57** only one equivalent UDP-galactose was used per reaction step. This strategy allowed the synthesis of compounds **61**, **62**

and **63**, which were galactosylated once, twice or three times, respectively. By NMR spectroscopy, a preference of the galactosyl transferase could be observed for the α -1,3-arm, followed by the α -1,6 and the β -1,2-arm. Sialylation of all three branches was observed for compound **64** by electrospray mass spectrometry. The unexpected galactosylation and subsequent sialylation of all the three branches of compound **57** suggests that this structural motif may also be found on *N*-glycans of the corresponding CHO-cells.



Compound **63** containing three galactose residues was used for the synthesis of neoglycoprotein **66** by coupling the carbohydrate moiety via the isothiocyanate derivative **65** to carbohydrate-free BSA. Thus, a neoglycoprotein with the Lec14 nonasaccharide has been provided for the first time for biological testing.

For the efficient symbiosis between leguminous plants and rhizobia NOD-factors secreted by the bacteria are essential. Since *N*-palmitoylglucosamine was considered as a minimal structural requirement for bioactivity by *Dazzo* and *Hollingsworth*, *N*-palmitoylglucosamine **70** and other monosaccharide derivatives have been synthesized for biological testing.

Testing of the effects on *medicago sativa* was performed in cooperation with *K. Niehaus* in Bielefeld and showed only low activity of the tested compounds. Therefore, these compounds should not be considered to contain the minimal structural requirements.

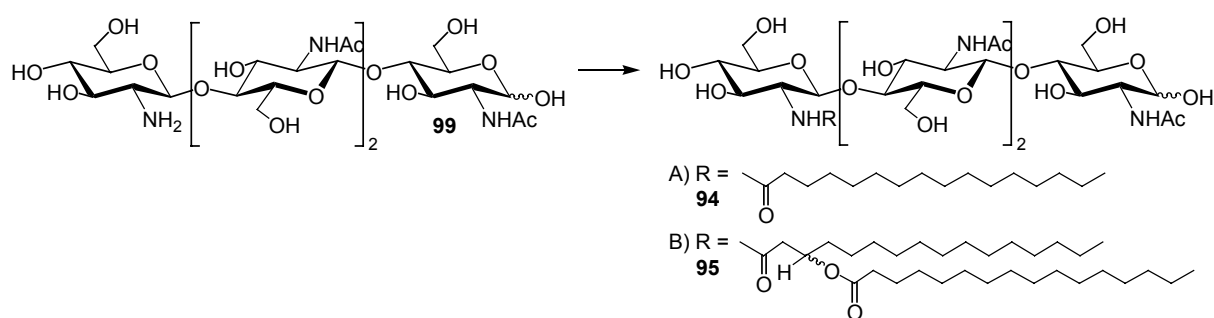
The influence of the monosaccharide derivatives on germination and growth of wheat and corn was investigated by Dr. *G. Kretzschmar* in Frankfurt. The results have to be verified by further testing.

For further investigation a synthesis of natural NOD factors and analogues was established. The monosaccharides **76** and **78** used in these syntheses can be prepared in large scale. The aminogroup of tetrasaccharide **84** is suitable for coupling with acylresidues.

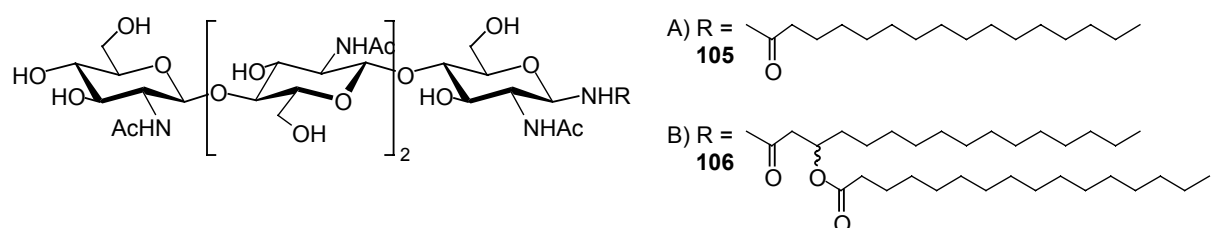
After the acylation of compound **84** and subsequent deprotecting steps, side products were found. Purification of the final products was very difficult because of the low solubility of compounds **94** and **95**.

Therefore, amino compound **99** was synthesized starting with compound **84**. After acylation via *N*-hydroxysuccinimide esters, the target compounds **94** and **95** were obtained.

7. Summary



Compound **83** is suitable for an easy access to analogues. After reduction of the azido group carboxylic acids were coupled to the reducing end. The final hydrogenation furnished the analogues **105** and **106**.



Compounds **94**, **95**, **105** and **106** represent four additional structures, which can be tested for their biological activities regarding the symbiosis between leguminous plants and rhizobia. The presented method offers an easy access to NOD factors and analogues. These can be used in biological studies to gain further information of NOD factors and their signaling pathways.

8. Experimenteller Teil

Die verwendeten Lösungsmittel waren von technischer Qualität und wurden durch Destillation gereinigt. Absolutierte Lösungsmittel wurden durch Destillation mit folgenden Trocknungsmitteln erhalten: Dichlormethan mit Diphosphorpentoxid, Methanol mit Magnesiumspänen, Tetrahydrofuran mit Kalium/Benzophenon. Dimethylformamid (p.a.-Qualität) wurde über Molekularsieb 4Å getrocknet. Pyridin, Dioxan und Acetonitril wurde in p.a.-Qualität eingesetzt. Als Schutzgas diente Argon. Molekularsieb 4Å (Kugeln) wurde von der Firma Fluka bezogen und vor der Verwendung bei Glycosylierungen gepulvert.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigfolien „Alugram Sil G/UV₂₅₄“ von Macherey-Nagel verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung im UV-Licht bei 254 nm und / oder Eintauchen in eine Reagenzlösung und nachfolgendes Erhitzen im Heißluftstrom. Zum Anfärben von Kohlenhydraten wurde eine 1:1-Mischung von 2N H₂SO₄ und 0.2 %-iger ethanolischer Resorcinmonomethyletherlösung verwendet.

Zur Flashchromatographie wurde Kieselgel 60 der Firma Merck mit Korngröße 0.040 - 0.063 mm (230 - 400 mesh ASTM) verwendet. Der Stickstoffdruck betrug 1.5 - 2.0 bar. Die angegebenen Mischungsverhältnisse verstehen sich als Volumenanteile.

Spezifische Drehwerte wurden an einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 bei 589 nm in 1 ml und 5 ml Küvetten der Länge 1 dm bestimmt.

UV-Spektren wurden an dem Gerät „Specord 200“ der Firma Analytik Jena mit der Software WinApsect 1.2 aufgezeichnet.

EI-Massenspektren wurden an einem MAT-8500-Spektrometer der Firma Finnigan (Datensystem MAT SS 300) nach Direkteinlass mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen. FAB-Spektren wurden am gleichen Gerät mit einer m-Nitrobenzylalkoholmatrix bei einer Beschleunigungsspannung von 5 kV gemessen. ESI-Massenspektren wurden an einem Micromass LCT-Spektrometer aufgenommen, das mit einer Agilent HP 1100 HPLC mit Dioden-Array-Detektor gekoppelt war. Für HPLC-MS-Läufe wurde eine C18-Säule verwendet (YMC-Pack ODS-A, 120Å, S-03 µm, Lösungsmittel: Wasser / Acetonitril mit je 0.1 % Ameisensäure). Direkteinlass wurde über eine Spritzenpumpe mit Wasser, Acetonitril oder Methanol oder Gemischen davon durchgeführt. MALDI-Massenspektren wurden mit einem Reflex III MALDI-TOF-MS der Firma Bruker gemessen. Das Gerät arbeitete mit einem gepulsten 337 nm Stickstofflaser. Es wurde im Linear Mode gearbeitet und ein HighMassdetektor eingesetzt. Als Beschleunigungsspannung wurden 20 kV gewählt. Zur Probenvorbereitung wurde 1 µl einer Lösung des betreffenden Glycoproteins (ca. 7 mg/ml) in

0.1 % TFA mit 1.5 µl einer Lösung von 33 Vol.-% Acetonitril in 0.1 % TFA und 2.5 µl einer gesättigten Lösung von Sinapinsäure in 0.1 % TFA vermischt und im Hochvakuum getrocknet.

NMR-Spektren wurden an einem Jeol JNM-EX-270-FT-Spektrometer, einem Bruker Avance 360 und einem Bruker Avance DRX-500-FT-Spektrometer gemessen. Als Lösungsmittel und interner Standard wurden $[D_6]$ -DMSO ($\delta(^1H) = 2.49$ ppm, $\delta(^{13}C) = 39.5$ ppm), CD_3CN ($\delta(^1H) = 1.93$ ppm, $\delta(^{13}C) = 1.3$ ppm) bzw. D_2O verwendet. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) und wurden in ppm, Kopplungskonstanten J in Hertz angegeben. Die Zuordnung erfolgte anhand von Spektrensätzen bestehend aus 1H , ^{13}C , HH-COSY, HH-TOCSY, NOESY, HMQC-COSY und HMQC-TOCSY Experimenten.

Die NMR-Spektren der *N*-Glycane wurden nach folgender Konvention zugeordnet (die angegebenen Nummern bzw. Buchstaben der einzelnen Ringe wurden nach den betreffenden Nummern der Atome hochgestellt geschrieben):

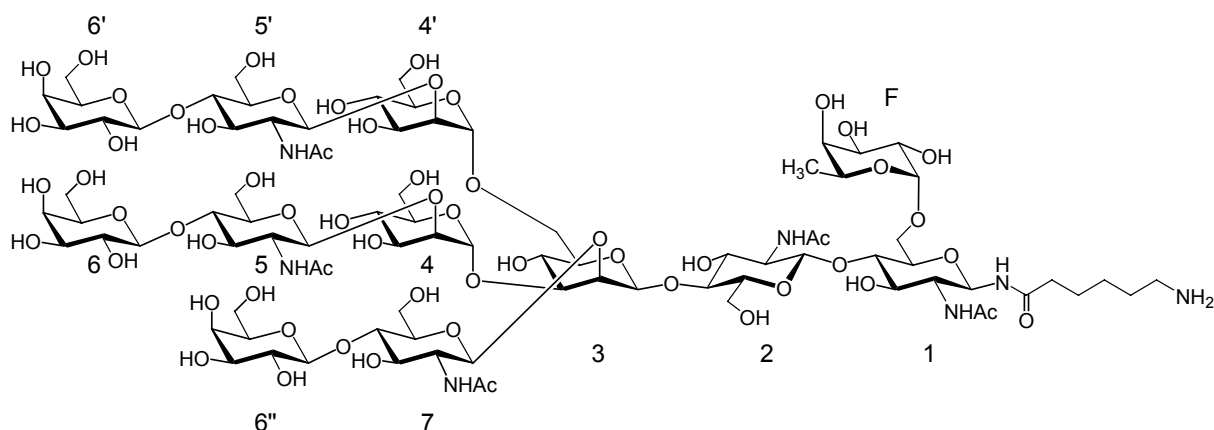


Abb. 8.1: Konvention zur Zuordnung und Bezeichnung der einzelnen Saccharideinheiten bei Lec14.

Atome der Acyloxyacylverbindungen wurden wie folgt zugeordnet und in den Spektren mit einem hochgestellten „ A'' “ bzw. „ A' “ markiert:

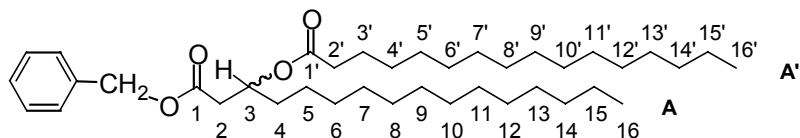


Abb. 8.2: Konvention zur Zuordnung und Bezeichnung der einzelnen Atome bei den beschriebenen Acyloxyacylverbindungen.

Die verwendeten Enzyme und Zuckernucleotide wurden von Sigma oder Boehringer Mannheim bezogen. Die α -2,3-Sialyltransferase wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. C. Paulson von der Cytel Corp., San Diego zur Verfügung gestellt.

8.1 Versuche zu Kapitel 3.1.1

3-O-Benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-6-tosyl-β-D-glucopyranosylazid 14

316 mg (0.745 mmol) Diol **1** und 1.42 g (7.45 mmol) Tosylchlorid werden in 30 ml Dichlormethan gelöst, mit 0.30 ml (3.73 mmol) Pyridin versetzt und bei Raumtemperatur 15 Stunden gerührt. Es wird eingengt, mit 10 ml Acetonitril, 3 ml Wasser und 2 ml Pyridin aufgenommen und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, um das restliche Tosylchlorid zu hydrolysieren. Man engt ein, destilliert dreimal mit je 10 ml Acetonitril und nimmt in Dichlormethan auf. Die organische Phase wird mit je zweimal 1N Salzsäure und ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 380 mg (88 %) amorph,

$R_f = 0.65$ (Hexan / Aceton, 1.2:1),

$C_{28}H_{26}N_4O_8S$ (578.60),

1H -NMR (300 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 7.88 - 7.70$ (m, 4H, NH), 7.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, Tosyl), 7.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, Tosyl), 6.93 – 6.83 (m, 5H, Benzyl), 5.88 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Hydroxyl), 5.37 (d, $J_{1,2} = 9.4$ Hz, 1H, H-1 β), 4.73 (d, $J_{gem} = 12.2$ Hz, 1H, OCH₂), 4.40 – 4.01 (m, 4H, CH₂O, H-3, H-6a, H-6b), 3.80-3.70 (m, 2H, H-2, H-5), 3.52 – 3.41 (m, 1H, H-4), 2.42 (s, 3H, CH₃).

3-O-Benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid 16

Eine Lösung von 180 mg (0.42 mmol) Diol **1** und 0.40 ml Lutidin in 10 ml absolutem Dichlormethan wird auf $-80^\circ C$ gekühlt und tropfenweise mit 118 μ l (0.72 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid versetzt. Nach 20 Minuten bei $-80^\circ C$ ist die Umsetzung vollständig (DC: Hexan / Aceton, 1.2:1). Es werden nacheinander 3ml 2N Natriumhydroxidlösung, 365 mg (2.94 mmol) *p*-Methoxyphenol und 0.1 ml Aliquat 336 zugegeben, anschließend wird die Kühlung entfernt. Nach 5 Stunden Rühren bei Raumtemperatur (DC: Hexan / Aceton, 1.2:1) wird mit Dichlormethan verdünnt, zweimal mit

2N Salzsäure und einmal mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (0.94 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 25 mm, Füllhöhe: 17 cm, Hexan / Essigsäureethylester, 2.5:1).

Ausbeute: 239 mg (86 %) amorph,

$R_f = 0.63$ (Hexan / Aceton, 1.2:1),

$[\alpha]_D^{20.5} = +14.0^\circ$ (0.2, Dichlormethan),

$C_{28}H_{26}N_4O_7$ (530.53),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 530.18$; $M_{gef} = 525.16$ ($M-N_3+Na$)⁺, 553.14 ($M+Na$)⁺.

1H -NMR (270 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 7.90$ -7.70 (m, 4H, Pht), 7.00-6.85 (m, 9H, OMp, Ph), 5.90 (d, $J_{4,OH} = 7.1$ Hz, 1H, 4-OH), 5.48 (d, $J_{1,2} = 9.4$ Hz, 1H, H-1 β), 4.80 (d, $J_{gem} = 12.0$ Hz, 1H, OCH₂), 4.44 (d, $J_{gem} = 12.0$ Hz, 1H, OCH₂), 4.30-4.10 (m, 3H, H-6a, H-3, H-6b), 3.92-3.82 (m, 2H, H-2, H-5), 3.75-3.62 (m, 4H, OCH₃, H-4).

^{13}C -NMR (67.94MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 167.40$ (C=O), 153.55, 152.54 (C-i OMp, C-4 OMp), 138.15 (C-i Ph), 134.79 (C-4/5 Pht), 130.66 (C-1/2 Pht), 127.79, 127.36 (C-2/6 Ph, C-3/5 Ph), 127.18 (C-4 Ph), 123.42 (C-3/6 Pht), 115.63, 114.69 (C-2/6 OMp, C-3/5 OMp), 85.10 (C-1), 78.25 (C-3), 76.94 (C-5), 73.67 (OCH₂), 70.98 (C-4), 67.56 (C-6), 55.30 (OCH₃), 54.60 (C-2).

8.2 Versuche zu Kapitel 3.1.1.1

3,6-Di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-ethylthioglucopyranosid 18

Eine Lösung von 30.0 g (56 mmol) Benzylidenacetal **17** in 300 ml Dichlormethan wird nach Zugabe von 10 g frisch geglühtem, gepulvertem Molekularsieb 4Å unter Eiskühlung 30 Minuten gerührt. Unter Schutzgas (Argon) werden 51.2 ml (321 mmol) auf 0°C vorgekühltes Triethylsilan zugegeben, anschließend tropft man 24.0 ml (236 mmol) Trifluoressigsäure innerhalb von 90 Minuten zu. Die Kühlung wird entfernt und das Gemisch weitere 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (DC: Hexan / Essigsäureethylester, 1:1). Es wird über Celite

filtriert, mit 2N Kaliumhydroxid-Lösung gewaschen, die wässrige Phase noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Es wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (40.7 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 15 cm, Füllhöhe: 10 cm, Cyclohexan / Essigsäureethylester, 4:1 => 1.5:1).

Ausbeute: 24.2 g (80 %) amorph,

$R_f = 0.76$ (Hexan / Essigsäureethylester, 1:1),

$[\alpha]_D^{25} = +32.8^\circ$ (1.0, Dichlormethan),

$C_{30}H_{31}NO_6S$ (533.64),

EI-MS: $M_{ber} = 533.19$; $M_{gef} = 533$ (M)⁺.

Elementaranalyse

(gef.)	C: 67.6 %	H: 5.83 %	N: 2.77 %
(ber.)	C: 67.5 %	H: 5.86 %	N: 2.62 %

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.85 - 7.72$ (m, 4H, Pht), $7.36 - 7.26$ (m, 5H, Ph), $6.95 - 6.87$ (m, 5H, Ph), 5.68 (d, $J_{OH-4,H-4} = 6.9$ Hz 1H, OH-4), 5.20 (d, $J_{1,2} = 10.3$ Hz, 1H, H-1 β), 4.77 (d, $J_{gem} = 12.2$ Hz, 1H, OCH₂), 4.56 (s, 2H, OCH₂), 4.42 (d, $J_{gem} = 12.2$ Hz, 1H, OCH₂), $4.14 - 4.07$ (m, 1H, H-3), 3.93 (dd, 1H, H-2), $3.81 - 3.78$ (m, 1H, H-6a), $3.66 - 3.44$ (m, 3H, H-6b, H-5, H-4), 2.56 (m, 2H, SCH₂), 1.08 (t, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (67.97 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 167.33, 167.15$ (C=O), $138.54, 138.21$ (C-i Ph), 134.69 (C-4/5 Pht), 130.66 (C-1/2 Pht), $128.15, 127.73, 127.36, 127.30, 127.05$ (C-Ar), 123.31 (C-3/6 Pht), 80.33 (C-1), 79.87 (C-5), 79.63 (C-3), $73.59, 72.22$ (OCH₂), 71.45 (C-4), 69.30 (C-6), 54.37 (C-2), 23.40 (S-CH₂), 15.01 (CH₃).

3,6-Di-O-benzyl-4-O-chloracetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-ethylthioglucopyranosid 19

Eine Lösung von 24.17 g (45 mmol) 3,6-Di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-ethylthioglucopyranosid **18** in 250 ml absolutem Dichlormethan wird mit 25 ml Pyridin versetzt und 15 Minuten bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von 13.2 g (136 mmol) Chloressigsäureanhydrid wird 15 Minuten gerührt (DC: Hexan / Aceton, 2:1). Es wird

dreimal mit 1N HCl und einmal mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Da das erhaltene Rohprodukt (27.45 g; quant.) laut NMR keine Verunreinigungen beinhaltet, wird es ohne zusätzliche Reinigung in den nachfolgenden Reaktionen verwendet.

Ausbeute: 30.0 g (quantitativ) amorph,

$R_f = 0.5$ (Hexan / Aceton, 2:1),

$C_{32}H_{32}ClNO_7S$ (610.12).

3,6-Di-O-benzyl-4-O-chloracetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylfluorid 20

32.27 g (52.89 mmol) Ethylthioglucopyranosid **19** werden in einem Kunststoffgefäß in 250 ml absolutem Dichlormethan gelöst und 10 Minuten unter Eiskühlung gerührt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 7.5 ml HF/Pyridin und 23.6 g *N*-Bromsuccinimid. Nach 20 Minuten (DC: Hexan / Aceton, 2:1) wird auf Eiswasser gegossen und vorsichtig mit festem Kaliumhydrogencarbonat neutralisiert. Die organische Phase wird zweimal mit 1N Salzsäure und einmal mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 9 cm, Füllhöhe: 8 cm, Hexan / Aceton, 2:1 => 1:2).

Ausbeute: 29.14 g (97 %) amorph,

$R_f = 0.48$ (Hexan / Aceton, 2:1),

$C_{30}H_{27}ClFNO_7$ (567.99).

(3,6-Di-O-benzyl-4-O-chloracetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid 21

3.23 g (6.09 mmol) Azid **16** und 4.50 g (7.92 mmol) Fluorid **20** werden in 80 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit 5.40 g frisch geglühtem, gepulvertem Molekularsieb 4Å versetzt und 60 Minuten gerührt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 0.37 ml (2.95 mmol) Bortrifluoridetherat. Nach 90 Minuten (DC: Hexan / Aceton, 2:1) wird mit Dichlormethan

verdünnt, über Celite filtriert, mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung entschützt.

$R_f = 0.24$ (Hexan / Aceton, 2:1),

$C_{58}H_{52}ClN_5O_{14}$ (1078.51).

*(3,6-Di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **22***

Das Rohprodukt **21** wird in 160 ml absolutem Dichlormethan und 80 ml absolutem Methanol gelöst, mit 1.60 g (11.52 mmol) Kaliumcarbonat versetzt und 10 Minuten gerührt (DC: Dichlormethan / Methanol, 80:1). Es wird filtriert, das Filtrat mit 0.60 ml Essigsäure auf einen pH von 5-6 eingestellt und eingeeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 65 mm, Füllhöhe: 12 cm, Hexan / Aceton, 2.5:1).

Ausbeute: 5.32 g (87 % über zwei Stufen) amorph,

$R_f = 0.20$ (Hexan / Aceton, 2:1),

$C_{56}H_{51}N_5O_{13}$ (1002.03),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1001.35$; $M_{gef} = 1024.43$ (M+Na)⁺.

8.3 Versuche zu Kapitel 3.1.1.2

*4,6-O-Benzyliden-2,3-O-trimethylsilyl-1-phenylthio- α -D-mannopyranosid **24***

4.00 g (11.09 mmol) Diol **23** werden in 20 ml Dichlormethan suspendiert und mit weiteren 15 ml Pyridin versetzt. Nach 5 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird die klare Lösung mit 350 mg DMAP versetzt und es werden 8.75 ml Trimethylsilylchlorid langsam zugetropft, wobei eine farblose breiige Masse ausfällt. Nach 60 Minuten (DC: Cyclohexan / Aceton, 1.5:1) wird eingeeengt und einmal mit 20 ml Toluol codestilliert. Nach Trocknen im Hochvakuum wird in Cyclohexan suspendiert, über Celite filtriert, eingeeengt, einmal mit 20 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 5.13 g eines farblosen Öls erhalten; davon werden 0.75 g in Hexan / Aceton, 1:1, gelöst, auf eine Kieselgelsäule

gegeben, mit Aceton gewaschen und mit Dichlormethan wieder eluiert, um eventuelle Reste von DMAP zu entfernen.

Ausbeute: 5.13 g (91 %) farbloses Öl,

$R_f = 0.83$ (Cyclohexan / Aceton, 1.5:1),

$C_{25}H_{36}O_5SSi_2$ (504.79),

EI-MS: $M_{ber} = 504.18$; $M_{gef} = 504$ (M^+).

1H -NMR (270 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 7.55 - 7.25$ (m, 10H, Ar), 5.68 (s, 1H, Ph-CH), 5.41 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1), 4.16 – 3.71 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 0.13, 0.07 (2s, 18H, SiMe₃).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 137.60$, 133.11 (C-i Ph), 131.47, 129.24, 128.75, 127.90, 127.59, 126.12 (C-Ph), 101.01 (Ph-CH), 89.32 (C-1; $J_{C-1,H-1} = 169.21$ Hz im gekoppelten HMQC-Spektrum), 77.74 (C-4), 74.34 (C-2), 69.76 (C-3), 67.28 (C-6), 65.57 (C-5), 0.33, 0.26 (SiMe₃).

4,6-O-Benzyliden-2,3-O-carbonyl-1-phenylthio- α -D-mannopyranosid 25

1.04 g (2.88 mmol) Diol **23** werden in 15 ml absolutem Dichlormethan suspendiert und mit 1.04 g (6.41 mmol) Carbonyldiimidazol versetzt. Nach 5 Minuten wird eine klare Lösung erhalten. Nach 75 Minuten Rühren bei Raumtemperatur (DC: Cyclohexan / Aceton, 2:1) wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 45 mm, Füllhöhe: 12 cm, Hexan / Aceton, 8:1).

Ausbeute: 679 mg (61 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.43$ (Cyclohexan / Aceton, 2:1),

$C_{20}H_{18}O_6S$ (386.42),

EI-MS: $M_{ber} = 386.08$; $M_{gef} = 386$ (M^+).

1H -NMR (270 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 7.63 - 7.21$ (m, 10H, Ar), 6.15 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1), 5.78 (s, 1H, Ph-CH), 5.20 (m, 2H, H-2, H-3), 4.18 – 4.03 (m, 3H, H-4, H-5, H-6a), 3.82 – 3.69 (m, 1H, H-6b).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 137.01 (C-i Ph), 132.78 – 126.78 (Ph), 100.75 (Ph-CH), 81.83 (C-1; $J_{\text{C-1,H-1}}$ = 170.21 Hz im gekoppelten HMQC-Spektrum), 77.79 (C-4), 76.24 (C-2), 74.81 (C-3), 67.23 (C-6), 60.92 (C-5).

4,6-O-Benzyliden-2,3-O-(p-methoxyphenyl)-1-phenylthio- α -D-mannopyranosid **26**

1.00 g (2.77 mmol) Diol **23** werden unter Argon in 10 ml DMF gelöst und unter Wasserbadkühlung portionsweise mit 685 mg (17 mmol) Natriumhydrid (60 % Suspension in Mineralöl) und anschließend mit 0.91 ml (6.66 mmol) *p*-Methoxybenzylchlorid versetzt. Nach 90 Minuten (DC: Cyclohexan / Aceton, 2:1) werden 5 ml Essigsäureanhydrid zugegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Es wird mit Dichlormethan verdünnt, die organische Phase mit Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird zweimal mit je 20 ml Toluol codestilliert (DMF) und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (ca. 1.8 g gelbes Öl) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 12 cm, Hexan / Aceton, 8:1).

Ausbeute: 1.13 g (68 %) harziges Öl,

R_f = 0.52 (Cyclohexan / Aceton, 2:1),

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ = +94.7° (0.3, Dichlormethan),

$\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{S}$ (600.72),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 600.22; M_{gef} = 623.24 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 7.48 – 6.82 (m, 18H, Ar), 5.71 (s, 1H, Ph-CH), 5.67 (d, $J_{1,2}$ < 1.0 Hz, 1H, H-1), 4.67 – 4.53 (m, 4H, OCH_2), 4.21 – 4.01 (m, 4H, H-4, H-5, H-2, H-6a), 3.88 – 3.68 (m, 8H, H-3, H-6b, OMe).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 158.85, 158.68 (C-4 Mpm), 137.71 (C-i Ph), 133.09 (C-1 Mpm), 131.43, 130.20, 129.94, 129.61, 129.15, 129.10, 128.72, 128.00, 127.53, 126.06 (C-Ph), 113.53 (C-3/5 Mpm), 100.64 (Ph-CH), 85.94 (C-1), 77.78 (C-4), 76.74 (C-2), 75.14 (C-3), 71.65, 70.63 (OCH_2), 67.42 (C-6), 65.25 (C-5), 54.89 (Mpm).

4,6-O-Benzyliden-2,3-O-trimethylsilyl-1-cyclohexyl-β-D-mannopyranosid 27

227 mg Silbertriflat werden unter Argon in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und unter Rühren auf -78°C gekühlt. 90 μl Phenylsulfenylchlorid werden mit 1 ml absolutem Dichlormethan verdünnt und zur Lösung gegeben. Anschließend werden 160 mg Donor **24** und 180 mg DTBMP in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst langsam zugegeben, die Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 2:1) zeigt sofortige Aktivierung des Donors. Nach 5 Minuten erfolgt tropfenweise Zugabe von 0.1 ml Cyclohexanol, gelöst in 2 ml absolutem Dichlormethan. Nach 35 Minuten (DC: Cyclohexan / Aceton, 2:1) wird mit Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Es wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (ca. 130 mg gelbes Öl) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 18 cm, Hexan / Essigsäureethylester, 10:1).

Ausbeute: 101 mg (64 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.90$ (Cyclohexan / Aceton, 2:1),

$\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{Si}_2$ (494.77),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 494.25$; $M_{\text{gef}} = 517.32$ ($M + \text{Na}$) $^{+}$.

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.48 - 7.32$ (m, 5H, Ph), 5.60 (s, 1H, Ph-CH), 4.72 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1), 4.13 (m, 1H, H-6a), 3.91 – 3.55 (m, 4H, H-3, H-6b, H-4, H-2), 3.29 (m, 1H, H-5), 1.89 – 1.15 (m, 10H, cyclohexyl), 0.10, 0.05 (2s, 18H, SiMe_3).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 137.92$ (C-i Ph), 128.63, 127.86, 126.24, 114.37 (C-Ph), 100.94 (Ph-CH), 98.65 (C-1; $J_{\text{C-1,H-1}} = 156.82$ Hz im gekoppelten HMQC-Spektrum), 78.52 (C-4), 75.63 (C-2), 74.03 (C-3), 71.72, 70.03, 67.03 (C-6), 66.59 (C-5), 33.14, 31.42, 25.17, 23.61, 23.43.

4,6-O-Benzyliden-1-cyclohexyl-α-D-mannopyranosid 28

199 mg (0.776 mmol) Silbertriflat werden unter Argon in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und unter Rühren auf -78°C gekühlt. 60 μl (0.518 mmol) Phenylsulfenylchlorid werden mit 1 ml absolutem Dichlormethan verdünnt und

zur Lösung gegeben. Anschließend werden 100 mg (0.259 mmol) Donor **25** und 159 mg (0.776 mmol) DTBMP in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst langsam zugegeben, die Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 2:1) zeigt sofortige Aktivierung des Donors. Nach 5 Minuten erfolgt tropfenweise Zugabe von 0.1 ml Cyclohexanol, gelöst in 1 ml absolutem Dichlormethan. Man lässt die Reaktion langsam auf Raumtemperatur kommen. Nach 4 Stunden ist die Reaktion abgeschlossen. Es wird mit Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (gelbes Öl) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 8 cm, Hexan / Essigsäureethylester, 10:1).

Ausbeute: 66 mg (68 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.63$ (Cyclohexan / Aceton, 2:1),

$C_{20}H_{24}O_7$ (376.40),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 376.15$; $M_{gef} = 399.24$ (M+Na)⁺.

Der so erhaltene farblose Feststoff (66 mg) wird ohne weitere Analytik direkt entschützt. Dazu wird das zuvor erhaltene Produkt in 5 ml Dichlormethan gelöst, mit 0.5 ml einer Lösung von 30 mg Natrium in 14 ml absolutem Methanol versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Minuten (DC: Cyclohexan / Aceton, 2:1) ist die Reaktion beendet. Es wird mit Dichlormethan verdünnt, zweimal mit Wasser gewaschen, eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 60 mg (66 % über 2 Stufen) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.47$ (Cyclohexan / Aceton, 2:1),

$[\alpha]_D^{21} = +78.9^\circ$ (0.4, Dichlormethan),

$C_{19}H_{26}O_6$ (350.41),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 350.17$; $M_{gef} = 373.20$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.49 - 7.34$ (m, 5H, Ph), 5.59 (s, 1H, Ph-CH), 5.10 (d, $J_{H-2,OH} = 4.07$ Hz, 1H, OH-2), 4.99 (d, $J_{H-3,OH} = 5.79$ Hz, 1H, OH-3), 4.83 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1), 4.11 (m, 1H, H-6a), 3.88 – 3.49 (m, 5H, H-4, H-6b, H-5, H-3, H-2), 1.88 – 1.15 (m, 10H, cyclohexyl).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 137.97 (C-i Ph), 128.71, 127.92, 126.32 (C-Ph), 101.11 (Ph-CH), 99.04 (C-1; $J_{\text{C-1,H-1}}$ = 168.30 Hz im gekoppelten HMQC-Spektrum), 78.65 (C-4), 74.09 (C-2), 71.49 (C-3), 68.04 (C-6), 67.57, 64.08 (C-5), 32.99, 31.02, 25.18, 23.53, 23.27.

4,6-O-Benzyliden-2,3-O-(p-methoxyphenyl)-1-cyclohexyl- β -D-mannopyranosid **29**

60 mg Silbertriflat werden unter Argon in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und unter Rühren auf -90°C gekühlt. 25 μl Phenylsulfenylchlorid werden mit 0.5 ml absolutem Dichlormethan verdünnt und zur Lösung gegeben. Anschließend werden 57 mg Donor **26** und 50 mg DTBMP, in 0.5 ml absolutem Dichlormethan gelöst, langsam zugegeben, die Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 2:1) zeigt sofortige Aktivierung des Donors. Es erfolgt tropfenweise Zugabe von 0.1 ml Cyclohexanol, verdünnt mit 0.4 ml absolutem Dichlormethan. Nach 10 Minuten (DC: Cyclohexan / Aceton, 2:1; Temp: -90°C) ist die Reaktion abgeschlossen. Es wird mit Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (farbloses Öl) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 25 mm, Füllhöhe: 10 cm, Hexan / Aceton, 10:1).

Ausbeute: 38 mg (77 %) farbloses Öl,

R_f = 0.56 (Cyclohexan / Aceton, 2:1),

$\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{O}_8$ (590.70),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 590.29; M_{gef} = 613.28 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 7.45 – 6.82 (m, 13H, Ar), 5.63 (s, 1H, Ph-CH), 4.77 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1), 4.76 – 4.46 (m, 4H, CH_2O), 4.15 (m, 1H, H-6a), 3.95 – 3.56 (m, 11H, H-4, H-6b, OMe, $\text{CH}_{\text{cyclohexyl}}$, H-3, H-2), 3.55 – 3.25 (m, 1H, H-5), 1.85 – 1.12 (m, 10H, cyclohexyl).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 158.60, 158.59 (C-4 Mpm), 137.88 (C-i Ph), 130.96, 130.62 (C-1 Mpm), 129.40, 128.80, 128.62, 127.98, 125.99 (C-Ph), 113.47, 113.33

(C-3/5 Mpm), 100.43 (Ph-CH), 99.29 (C-1; $J_{C-1,H-1} = 156.09$ Hz im gekoppelten HMQC-Spektrum), 77.85 ($\text{CH}_{\text{cyclohexyl}}$), 77.45 (C-2), 76.72 (C-4), 75.24 (C-3), 73.95, 70.38 (OCH_2), 67.89 (C-6), 66.65 (C-5), 54.99 (Mpm), 35.33, 32.88, 31.02, 25.32, 23.75.

*(4,6-O-Benzyliden-2,3-O-trimethylsilyl- α,β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **32***

Zur Darstellung des gewünschten Trisaccharids **32** wurden mehrere Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von Donor, Akzeptor, Base und Aktivator bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt; der vielversprechendste Versuch ist im Folgenden wiedergegeben:

165 mg (0.64 mmol) Silbertriflat werden unter Argon in 2 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und unter Rühren auf -85°C gekühlt. 70 μl (0.61 mmol) Phenylsulfenylchlorid werden mit 1 ml absolutem Dichlormethan verdünnt und zur Lösung gegeben. Anschließend werden 230 mg (0.45 mmol) Donor **24** und 300 mg (1.46 mmol) DTBMP, in 0.8 ml absolutem Dichlormethan gelöst, langsam zugegeben, die Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 2:1) zeigt 10 Minuten danach Aktivierung des Donors. Es erfolgt tropfenweise Zugabe von 150 mg (0.15 mmol) Akzeptor **30**, gelöst in 1 ml absolutem Dichlormethan. Die Temperatur wird auf -75°C gehalten. Die jeweils in Abständen von 5 Minuten genommenen Proben (DC: Cyclohexan / Aceton, 2:1) zeigen Einsetzen der gewünschten Reaktion an, jedoch entstehen auch unerwünschte Nebenprodukte. Nach 60 Minuten wird in Kaliumhydrogencarbonatlösung gegossen, die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (farbloser kristalliner Rückstand) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 30 mm, Füllhöhe: 11 cm, Hexan / Aceton, 5:1). Es werden 4 Fraktionen mit 45, 24, 5 bzw. 63 mg erhalten. In Fraktion I (45 mg) wird ausschließlich der an Position 4 trimethylsilylierte Akzeptor **31** gefunden, Fraktion II (24 mg) enthält ein Gemisch aus trimethylsilyliertem Akzeptor **31** und gewünschtem Trisaccharid **32** (Verhältnis ca. 1:1) und einem weiteren niedermolekularen, nicht identifizierten Nebenprodukt; Fraktion III (5 mg) enthält ein nicht identifiziertes Nebenprodukt und Fraktion IV (63 mg) enthält schließlich reisolierten Akzeptor **30** und zwei nicht weiter charakterisierte Nebenprodukte.

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 1379.52$; $M_{\text{gef}} = 1008.17$ (**30**+Na)⁺; $M_{\text{gef}} = 1080.17$ (**31**+Na)⁺; $M_{\text{gef}} = 1402.26$ (**32**+Na)⁺.

*(4,6-O-Benzyliden-2,3-O-(p-methoxyphenyl)- α,β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **34***

Zur Darstellung des gewünschten Trisaccharids **34** wurden mehrere Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von Donor, Akzeptor, Base und Aktivator bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt; der vielversprechendste Versuch ist im Folgenden wiedergegeben:

120 mg Silbertriflat werden unter Argon in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und unter Rühren auf -90°C gekühlt. 50 μl Phenylsulfenylchlorid werden mit 0.5 ml absolutem Dichlormethan verdünnt und zur Lösung gegeben. Anschließend werden 100 mg Donor **26** und 100 mg DTBMP, in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst, langsam zugegeben, die Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 2:1) zeigt sofortige Aktivierung des Donors. Es erfolgt tropfenweise Zugabe von 330 mg Akzeptor **30**, gelöst in 1 ml absolutem Dichlormethan (Kühlbadtemperatur: -85°C). Man lässt auf Raumtemperatur kommen und rührt insgesamt 7 Stunden. Es wird mit Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 12 cm, Cyclohexan / Aceton, 10:1).

Es werden 4 Fraktionen mit 4, 57, 55 bzw. 170 mg erhalten. In Fraktion II (57 mg) wird das 1-1-verknüpfte Dimannosid **33** und ein nicht identifiziertes Nebenprodukt gefunden, Fraktionen III (55 mg) und IV (170 mg) enthalten ein Gemisch aus Akzeptor **30**, einem geringen Prozentsatz an Trisaccharid **34** und einem weiteren, nicht identifizierten Nebenprodukt.

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 1475.55$; $M_{\text{gef}} = 1008.30$ (**30**+Na)⁺, $M_{\text{gef}} = 1021.35$ (**33**+Na)⁺, $M_{\text{gef}} = 1498.37$ (**34**+Na)⁺.

8.4 Versuche zu Kapitel 3.1.1.3

(4,6-O-Benzyliden-2-O-chloracetyl-3-phenylcarbamoyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid 37

Eine Suspension aus 4.36 g (4.36 mmol) Disaccharidazid **22**, 5.76 g (9.46 mmol) Trichloracetimidat **36** und 5.0 g frisch geglühtem, gepulvertem Molekularsieb 4 Å in 180 ml absolutem Dichlormethan wird 30 Minuten bei 0°C gerührt. Anschließend erfolgt tropfenweise Zugabe von 470 µl (2.62 mmol) Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure. Man läßt auf Raumtemperatur kommen und rührt weitere 4 Stunden (DC: Cyclohexan / Aceton, 1.5:1), verdünnt mit Dichlormethan und filtriert über Kieselgur. Das Filtrat wird mit gesättigter Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt (gelber, amorpher Schaum) wird ohne weitere Reinigung für die Entschützung eingesetzt.

$R_f = 0.45$ (Hexan / Aceton, 1.5:1).

(4,6-O-Benzyliden-3-phenylcarbamoyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid 38

Das Rohprodukt **37** wird in 90 ml absolutem Dichlormethan und 45 ml absolutem Methanol gelöst, mit 2.0 g (14.5 mmol) fein gepulvertem Kaliumcarbonat versetzt und bei Raumtemperatur 30 Minuten gerührt. Es wird filtriert, das Filtrat mit 0.15 ml Eisessig auf einen pH von 5 bis 6 eingestellt und eingeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 90 mm, Füllhöhe: 16 cm, Cyclohexan / Aceton, 4:1).

Ausbeute: 2.99 g (50 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.10$ (Cyclohexan / Aceton, 2:1),

$C_{76}H_{70}N_6O_{19}$ (1371.40),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1370.47$; $M_{gef} = 1393.42$ (M+Na)⁺.

(4,6-O-Benzyliden-β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid **39**

1. Darstellung des Trifluormethansulfonats **38a**

12.73 g (9.29 mmol) des Trisaccharids **38** werden in 450 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit 6.0 ml trockenem Pyridin versetzt und unter Rühren auf -40°C gekühlt. Anschließend tropft man langsam 3.22 ml (19.62 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid zu, bringt die Reaktionsmischung innerhalb von 10 Minuten auf 0°C und rührt weiter bei 0°C. Nach 2 Stunden (DC: Hexan / Aceton, 1.5:1) wird bei 0°C unter Vakuum eingeeengt und der amorphe Feststoff im Hochvakuum 20 Minuten bei 0°C getrocknet. Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung zur Darstellung des Iminocarbonats **38b** umgesetzt.

2. Darstellung des Iminocarbonats **38b**

Der Rückstand aus der Darstellung von **38a** wird mit 60 ml trockenem Dimethylformamid und 6 ml trockenem Pyridin versetzt und 3 Stunden bei 65°C gerührt (DC: Dichlormethan / Methanol, 50:1 und 70:1). Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum bei 45°C eingeeengt und getrocknet. Der Rückstand wird in 500 ml Dichlormethan gelöst, mit gesättigter Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet.

3. Darstellung des Carbonats **38c**

Verbindung **38b** wird in 60 ml Dioxan gelöst, mit einer Lösung aus 18 ml Essigsäure in 12 ml Wasser versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur, 10 Stunden bei 4°C und 3 Stunden bei Raumtemperatur belassen (DC: Dichlormethan / Methanol, 50:1 und 70:1). Die Reaktionsmischung wird unter Vakuum bei Raumtemperatur eingeeengt, zweimal mit je 20 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 600 ml Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit 2n HCl und einmal mit gesättigter Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet.

4. Hydrolyse zum β -Mannosid **39**

Verbindung **38c** wird in 400 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 20 ml einer Natriummethanolatlösung (0.1 %) versetzt. Nach 50 Minuten Rühren bei Raumtemperatur (DC: Hexan / Aceton, 1.5:1) wird mit Essigsäure neutralisiert, eingengt und einmal mit 20 ml Toluol codestilliert. Der amorphe Feststoff wird in Dichlormethan aufgenommen, mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 70 mm, Füllhöhe: 18 cm, Cyclohexan / Aceton, 3:1 \Rightarrow 2:1).

Ausbeute: 6.12 g (55 % über 4 Stufen) amorpher Feststoff,

R_f **38a** = 0.52 (Hexan / Aceton, 1.5:1),

R_f **38b** = 0.51 (Hexan / Aceton, 1.5:1),

R_f **38c** = 0.38 (Hexan / Aceton, 1.5:1),

R_f **39** = 0.30 (Hexan / Aceton, 1.5:1),

$C_{69}H_{65}N_5O_{18}$ (1252.28),

FAB-MS: M_{ber} = 1251.43; M_{gef} = 1251 (M), 1274 (M + Na).

8.5 Versuche zu Kapitel 3.1.2

*(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-(4,6-O-benzyliden- β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **41***

2.62 g (2.09 mmol) Trisaccharid **39**, 3.42 g (3.94 mmol) Trichloracetimidat **40** und 3.00 g gepulvertes, frisch geglühtes Molekularsieb 4Å werden im Hochvakuum getrocknet und unter Argon in 60 ml absolutem Dichlormethan bei -25°C für 30 Minuten gerührt. Die Lösung wird mit 130 μl Bortrifluoridetherat versetzt und innerhalb von 2 Stunden auf -15°C gebracht. Danach wird noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt (DC: Cyclohexan / Aceton, 1.5:1), mit Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch

Flashchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 3:1 => 2:1; Säulendurchmesser 60 mm, Füllhöhe: 15 cm).

Ausbeute: 3.23 g (79 %) amorph,

$R_f = 0.46$ (Hexan / Aceton, 1:1),

$[\alpha]_D^{23} = -5.3^\circ$ (0.4, Dichlormethan),

$C_{101}H_{100}N_6O_{35}$ (1957.89),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1956.62$; $M_{gef} = 1979.77$ (M+Na)⁺.

(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-(4,6-O-benzyliden-β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid **44**

2.12 g (1.08 mmol) Pentasaccharid **41**, 3.33 g (7.59 mmol) Fluorid **42** und 7.50 g gepulvertes, frisch geglühtes Molekularsieb 4Å werden im Hochvakuum getrocknet und unter Argon in 40 ml absolutem Acetonitril bei -25°C für 50 Minuten gerührt. Die Lösung wird bei -22°C langsam mit 412 µl (3.25 mmol) Bortrifluoridetherat versetzt und bei genau -20°C gehalten. Nach 30 Minuten (DC: Cyclohexan / Aceton, 1:1) wird die Reaktion mit 452 µl (3.25 mmol) Triethylamin gestoppt, mit Dichlormethan verdünnt und über Celite filtriert. Das Filtrat wird mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 1.5:1; Säulendurchmesser 65 mm, Füllhöhe: 15 cm).

Ausbeute: 1.96 g (76 %) amorph,

$R_f = 0.47$ (Hexan / Aceton, 1:1),

$[\alpha]_D^{23} = +30.6^\circ$ (0.5, Dichlormethan),

$C_{121}H_{119}N_7O_{44}$ (2375.26),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 2373.73$; $M_{gef} = 2392.24$ (M+Na)⁺.

^1H -NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ = 7.92 – 7.65 (m, 16H, Ph), 7.58 – 6.45 (m, 24H, Ar), 5.90 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.74$ Hz, 1H, H-3⁷), 5.48 – 5.38 (m, 5H, H-1⁷ (d, $J_{1,2} = 8.25$ Hz), PhCH=, H-3⁵, H-1², H-1¹), 5.08 (d, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.16$ Hz, 1H, H-3⁴), 4.89 – 4.77 (m, 6H, H-4⁷, H-4⁴, H-4⁵, H-1⁴, CH₂O, H-1⁵), 4.65 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 4.48 (2d, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, 2H, CH₂O), 4.36 (d, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, 1H, CH₂O), 4.22 – 4.20 (m, 2H, H-4¹, H-3¹), 4.14 – 4.03 (m, 5H, H-6a⁷, H-2⁷, H-6a¹, H-6b⁷, H-2⁵), 3.99 – 3.66 (m, 17H, H-2⁴, H-6b¹, H-2², H-2³, H-6a⁵, H-2¹, H-5⁴, H-5¹, H-6a², H-5⁷, H-3², H-6b⁵, H-6a³, H-3³, PhOCH₃), 3.64 – 3.52 (m, 5H, H-4², H-5², H-4³, H-6b³, H-6a⁴), 3.36 (m, 1H, H-6b⁴), 3.24 (m, 1H, H-6b²), 3.04 – 2.97 (m, 3H, CH₂O, H-5³), 2.23 (m, 1H, H-5⁵), 2.04, 2.01, 2.00, 1.92, 1.88, 1.85, 1.83, 1.78, 1.67 (9s, 27H, OAc).

^{13}C -NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ = 184.32, 170.08, 170.04, 169.80, 169.78, 169.76, 169.70, 169.60, 169.26, 169.18, 168.40, 167.49, 167.07, 166.26 (C=O), 154.00, 152.05 (C-4 Omp, C-i Omp), 138.24, 138.14, 138.05, 137.54 (C-i Ar), 135.04 (C-4/5 Ph), 131.28, 130.93, 130.73, 130.53 (C-1/2 Ph), 128.43, 128.23, 127.98, 127.82, 127.62, 127.43, 127.41, 127.30, 126.85, 125.55 (Ar), 123.64 (C-3/6 Ph), 116.22, 114.78 (C-2/6 Omp, C-3/5 Omp), 101.95 (C-1³; $J_{\text{C-1,H-1}} = 165.23$ Hz), 101.07 (PhCH=; $J_{\text{C,H}} = 164.33$ Hz), 97.50 (C-1⁷; $J_{\text{C-1,H-1}} = 168.84$ Hz), 96.88 (C-1⁴; $J_{\text{C-1,H-1}} = 176.97$ Hz), 96.20 (C-1²; $J_{\text{C-1,H-1}} = 167.94$ Hz), 94.96 (C-1⁵; $J_{\text{C-1,H-1}} = 168.84$ Hz), 84.63 (C-1¹; $J_{\text{C-1,H-1}} = 167.03$ Hz), 81.29 (C-4²), 77.51 (C-4³), 76.77 (C-3²), 76.15 (C-3¹), 75.97 (C-2³), 74.79 (C-4¹, C-5¹), 74.54 (C-3³), 73.37 (C-5²), 73.18 (CH₂O), 72.56 (C-2⁴, C-6²), 72.01 (CH₂O), 71.02 (C-5⁷), 70.48 (C-5⁵), 69.22 (C-3⁵), 68.98 (C-3⁷), 68.91 (C-4⁷), 68.85 (C-6³), 68.48 (C-3⁴), 67.74 (C-4⁵), 67.37 (C-5⁴), 67.00 (CH₂O), 66.56 (C-6¹), 65.20 (C-5³), 64.71 (C-4⁴), 61.86 (C-6⁷), 61.37 (C-6⁴), 60.50 (C-6⁵), 55.61 (C-2²), 55.00 (CH₃Oph), 54.25 (C-2¹), 54.13 (C-2⁷), 53.20 (C-2⁵), 20.57, 20.53, 20.50, 20.29, 20.27, 20.22, 20.09 (OAc).

(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid 47

2.05 g (0.87 mmol) Benzylidenacetal **44** werden in 200 ml Acetonitril gelöst und mit 3.50 g *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Nach 90 Minuten Rühren bei Raumtemperatur (DC: Cyclohexan / Aceton, 1:1) wird mit 2.96 ml (36.78 mmol) Pyridin neutralisiert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit 1N Salzsäure und ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 3:1 => 1:1; Säulendurchmesser: 60 mm, Füllhöhe: 14 cm).

Ausbeute: 1.58 g (80 %); nach Reisolierung des Edukts und nochmaliger Entschüttung: 1.76 g (89 %) amorph,

$R_f = 0.41$ (Hexan / Aceton, 1:1),

$[\alpha]_D^{23} = +69.0^\circ$ (0.6, Dichlormethan),

$C_{114}H_{115}N_7O_{44}$ (2287.15),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 2285.70$; $M_{gef} = 2310.58$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆] DMSO): $\delta = 7.89 - 7.60$ (m, 16H, Pht), $7.20 - 6.71$ (m, 19H, Ar), 5.82 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.37$ Hz, 1H, H-3⁷), 5.65 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.14$ Hz, 1H, H-3⁵), 5.47 (d, $J_{1,2} = 8.22$ Hz, 1H, H-1⁷), 5.37 (d, $J_{1,2} = 5.25$ Hz, 1H, OH-4³), 5.32 (d, $J_{1,2} = 9.48$ Hz, 1H, H-1¹), 5.29 (d, $J_{1,2} = 8.45$ Hz, 1H, H-1⁵), 5.18 (m, 1H, H-1²), $5.05 - 4.86$ (m, 4H, H-4⁵, H-4⁴, H-3⁴, H-4⁷), $4.78 - 4.76$ (m, 2H, H-1⁴, CH₂O), 4.48 (d, $J_{gem} = 12.33$ Hz, 1H, CH₂O), 4.47 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), $4.38 - 4.34$ (m, 3H, 2 CH₂O, H-2⁴), 4.32 (d, $J_{gem} = 12.33$ Hz, 1H, CH₂O), 4.25 (m, 1H, H-6a⁵), $4.19 - 4.10$ (m, 4H, H-2⁵, H-6a⁷, H-4¹, H-3¹), $4.03 - 3.99$ (m, 4H, H-2⁷, H-6b⁵, H-6a¹, H-6b⁷), $3.91 - 3.64$ (m, 14H, H-2², H-6b¹, H-5⁵, H-5⁴, H-3², H-2¹, H-2³, H-5¹, H-6a⁴, H-5⁷, OH-6, PhOCH₃), $3.57 - 3.52$ (m, 4H, CH₂O, H-6b⁴, H-6a², H-4²), $3.37 - 3.25$ (m, 4H, H-6a³, H-4³, H-6b², H-5²), $3.19 - 3.17$ (m, 1H, H-3³), 3.02 (m, 1H, H-6b³), 2.85 (m, 1H, H-5³), $2.06, 1.99, 1.98, 1.95, 1.94, 1.84, 1.82, 1.81, 1.78$ (9s, 27H, OAc).

^{13}C -NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ = 170.17, 170.01, 169.83, 169.69, 169.61, 169.57, 169.33, 169.22, 169.07, 168.01, 167.56, 167.27, 167.12 (C=O), 153.76, 151.86 (C-4 OMp, C-i OMp), 138.68, 137.93 (C-i Ar), 134.81 - 134.61 (C-4/5 Pht), 131.00, 130.73, 130.56, 130.45 (C-1/2 Pht), 128.18, 127.79, 127.48, 127.37, 127.29, 127.12, 126.70, 126.57 (Ar), 123.51, 123.45 (C-3/6 Pht), 115.33, 114.32 (C-2/6 OMp, C-3/5 OMp), 100.55 (C-1³), 98.50 (C-1⁴), 97.40 (C-1⁷), 96.13 (C-1²), 96.11 (C-1⁵), 84.78 (C-1¹), 80.57 (C-4²), 78.14 (C-3³), 77.57 (C-3²), 76.55 (C-5³), 76.20 (C-3¹), 75.82 (C-2³), 74.89 (C-4¹, C-5¹), 73.73 (C-5²), 73.70 (2 CH₂O), 73.39 (2 CH₂O), 73.02 (C-2⁴), 72.10 (2 CH₂O), 70.99 (C-5⁷), 70.96 (C-5⁵), 69.59 (C-3⁵), 69.28 (C-3⁴), 69.22 (C-3⁷), 68.68 (C-4⁷), 68.67 (C-6²), 68.47 (C-4⁵), 67.39 (C-5⁴), 66.54 (C-6¹), 65.98 (C-4³), 64.92 (C-4⁴), 61.71 (C-6⁷), 61.68 (C-6⁵), 61.30 (C-6⁴), 61.05 (C-6³), 55.99 (C-2²), 55.21 (CH₃OPh), 54.61 (C-2⁷), 54.49 (C-2¹), 53.61 (C-2⁵), 20.46, 20.39, 20.30, 20.20, 20.13, 20.11, 20.09, 20.04 (OAc).

8.6 Versuche zu Kapitel 3.1.3

*(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]- β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **48***

1.46 g (0.64 mmol) Hexasaccharid **47**, 1.79 g (2.07 mmol) Trichloracetimidat **40** und 2.90 g gepulvertes, frisch geglühtes Molekularsieb 4Å werden im Hochvakuum getrocknet und unter Argon in 150 ml absolutem Dichlormethan bei -50°C für 45 Minuten gerührt. Die Lösung wird bei -50°C langsam mit 40.3 μl (318.08 μmol) Bortrifluoridetherat versetzt. Anschließend lässt man innerhalb von 3 Stunden langsam auf -10°C (DC: Cyclohexan / Aceton, 1:1) auftauen. Es wird mit Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Man engt ein und trocknet im Hochvakuum. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 1.5:1 \Rightarrow 1:1; Säulendurchmesser: 60 mm, Füllhöhe: 15 cm).

Ausbeute: 1.61 g (76 %) amorph,

$R_f = 0.32$ (Hexan / Aceton, 1:1),

$[\alpha]_D^{23} = +33.2^\circ$ (0.4, Dichlormethan),

$C_{146}H_{150}N_8O_{61}$ (2992.77),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 2990.89$; $M_{gef} = 3014.75$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆] DMSO): $\delta = 7.84 - 7.59$ (m, 20H, Pht), $7.22 - 6.70$ (m, 19H, Ar), 5.77 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.83$ Hz, 1H, H-3⁷), $5.69 - 5.62$ (m, 2H, H-3⁵, H-3^{5'}), 5.49 (m, 2H, H-1⁷, OH-4³), $5.34 - 5.30$ (m, 2H, H-1⁵, H-1¹), 5.21 (d, $J_{1,2} = 8.66$ Hz, 1H, H-1^{5'}), 5.11 (d, $J_{1,2} = 8.31$ Hz, 1H, H-1²), $5.07 - 4.89$ (m, 5H, H-4⁵, H-4⁴, H-4^{5'}, H-3⁴, H-4⁷), $4.81 - 4.75$ (m, 3H, H-4^{4'}, CH₂O, H-1⁴), 4.64 (dd, $J_{3,4} = 9.83$ Hz, $J_{2,3} = 2.34$ Hz, 1H, H-3^{4'}), $4.44 - 4.39$ (m, 4H, H-1³, H-2⁴, CH₂O), $4.33 - 4.27$ (m, 3H, 2 CH₂O, H-6a⁵), $4.19 - 3.69$ (m, 24H, H-6a⁷, H-2⁵, H-1^{4'}, H-6a^{5'}, H-3¹, H-4¹, H-2^{5'}, H-6b⁷, H-6b⁵, H-2⁷, H-6a¹, H-5⁵, H-5⁴, H-6b^{5'}, H-2², H-6b¹, H-2¹, H-2^{4'}, H-6a⁴, H-5⁷, H-3², H-5^{5'}, H-2³, H-5¹), $3.65 - 3.56$ (m, 6H, PhOCH₃, CH₂O, H-6b⁴, H-4²), $3.50 - 3.44$ (m, 2H, H-6a², H-6a^{4'}), $3.30 - 3.20$ (m, 5H, H-6b², H-6b^{4'}, H-4³, H-5^{4'}, H-3³), $3.15 - 3.13$ (m, 1H, H-6a³), $3.04 - 3.01$ (m, 3H, H-5², H-6b³, H-5³), 2.07, 1.99, 1.97, 1.96, 1.90, 1.88, 1.87, 1.85, 1.84, 1.83, 1.80, 1.79, 1.78 (15s, 45H, OAc).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆] DMSO): $\delta = 170.19, 170.03, 169.98, 169.84, 169.73, 169.64, 169.61, 169.58, 169.22, 169.17, 169.10, 168.01, 167.07$ (C=O), 153.77, 151.91 (C-4 OMp, C-i OMp), 137.99 (C-i Ar), 134.82 (C-4/5 Pht), 130.75, 130.62, 130.55 (C-1/2 Pht), 128.17, 127.71, 127.38, 127.35, 127.22, 127.16, 127.10, 127.02, 126.61, 126.57 (Ar), 123.43, 123.32 (C-3/6 Pht), 115.87, 114.57 (C-2/6 OMp, C-3/5 OMp), 100.25 (C-1³), 98.37 (C-1⁴; $J_{C-1,H-1} = 175.9$ Hz), 97.07 (C-1⁷; $J_{C-1,H-1} = 167.9$ Hz), 96.69 (C-1^{4'}; $J_{C-1,H-1} = 172.9$ Hz), 96.06 (C-1²; $J_{C-1,H-1} = 168.9$ Hz), 95.85 (C-1⁵; $J_{C-1,H-1} = 167.9$ Hz), 95.78 (C-1^{5'}; $J_{C-1,H-1} = 166.8$ Hz), 84.45 (C-1¹; $J_{C-1,H-1} = 168.9$ Hz), 79.49 (C-4²), 78.11 (C-3³), 77.25 (C-3²), 76.22 (C-3¹), 75.96 (C-2³), 74.79 (C-4¹), 74.73 (C-5¹), 74.15 (C-5³), 73.33 (CH₂O), 73.27 (C-2⁴), 73.27 (C-5²), 71.89 (CH₂O), 71.85 (C-2⁴), 70.75 (C-5⁵), 70.73 (C-5⁷), 70.54 (C-5^{5'}), 69.42 (C-3⁵), 69.28 (C-3^{5'}), 69.28 (C-3⁴), 69.20 (C-3⁷), 68.79 (C-3^{4'}), 68.36 (C-4⁷), 68.23 (C-4⁵, C-4^{5'}), 68.03 (C-6²), 67.95 (C-6³), 67.39 (C-5⁴), 67.04 (C-5^{4'}), 66.29 (C-6¹), 66.22 (C-4³), 64.60 (C-4⁴), 64.32 (C-4^{4'}), 61.48 (C-6⁷, C-6⁵), 61.26 (C-6⁴), 61.12 (C-6^{5'}), 61.11 (C-6⁴), 55.58 (C-2²), 54.95 (CH₃OPh), 54.42 (C-2⁷), 54.18 (C-2¹), 53.55 (C-2⁵), 53.41 (C-2⁵), 20.46, 20.45, 20.43, 20.41, 20.40, 20.37, 20.34, 20.30, 20.23, 20.20, 20.15, 20.12, 20.10, 20.08 (OAc).

(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-4-O-acetyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxyphenyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid **49**

1.47 g (493.52 μmol) Octasaccharid **48** werden in 60 ml Pyridin gelöst, bei 0°C für 10 Minuten gerührt und mit 30 ml (319.42 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wird nach 18 Stunden eingeeengt, dreimal mit je 20 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Der hellbeige Schaum wird in 500 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 1N HCl und ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung für die nachfolgende Entschützung verwendet.

Ausbeute: quantitativ,

$R_f = 0.26$ (Hexan / Aceton, 1:1),

$[\alpha]_D^{23} = +16.5^\circ$ (0.3, Dichlormethan),

$C_{148}H_{152}N_8O_{62}$ (3034.81),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 3032.90$; $M_{gef} = 3055.57$ ($M+Na$)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆] DMSO): $\delta = 7.98 - 6.51$ (m, 39H, Ar), 5.97 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.00$ Hz, 1H, H-3⁷), 5.71 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.00$ Hz, 1H, H-3⁵), 5.60 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.14$ Hz, 1H, H-3⁵), 5.45 (d, $J_{1,2} = 8.38$ Hz, 1H, H-1⁷), 5.34 (d, $J_{1,2} = 9.26$ Hz, 1H, H-1¹), 5.30 – 5.19 (m, 3H, H-1⁵, H-1², H-1⁵), 5.08 – 4.94 (m, 4H, H-4⁵, H-4⁴, H-4⁵, H-4⁷), 4.88 – 4.66 (m, 5H, H-3⁴, H-4⁴, CH₂O, H-4³, H-1³), 4.56 – 4.42 (m, 4H, H-1⁴, H-3⁴, 2 x CH₂O), 4.36 – 4.08 (m, 10H, CH₂O, H-6a⁵, H-6a⁷, H-6a⁵, H-2⁵, H-4¹, H-2⁷, H-2⁵, CH₂O, H-3¹), 4.08 – 3.73 (m, 18H, H-1⁴, H-6a¹, H-6b⁷, H-6b⁵, H-6b⁵, H-5⁵, H-2⁴, H-6b¹, H-5⁴, H-5⁵, H-6a⁴, H-2², H-2³, H-2¹, H-5⁷, H-2⁴, H-5¹, H-3²), 3.73 – 3.55 (m, 6H, H-3³, H-6a², PhOCH₃, H-4²), 3.55 – 3.43 (m, 3H, H-6b⁴, H-5², H-6b²), 3.43 – 3.16 (m, 4H, H-6a⁴, CH₂O, H-6b⁴, H-5³), 2.88 (m, 1H, H-5⁴), 2.79 (m, 1H, H-6a³), 2.69 (m, 1H, H-6b³), 2.18, 2.11, 2.03, 2.00, 1.99, 1.98, 1.97, 1.93, 1.92, 1.91, 1.90, 1.87, 1.81, 1.81, 1.79, 1.78 (16s, 48H, OAc).

^{13}C -NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ = 170.22, 170.06, 169.79, 169.72, 169.68, 169.61, 169.27, 169.20, 169.04, 168.97, 167.10, 167.06, 166.97 (C=O), 153.84, 151.83 (C-4 OMp, C-i OMp), 138.05, 137.90, 137.80 (C-i Ar), 135.08, 134.84 (C-4/5 Pht), 130.757, 130.65, 130.57, 130.40 (C-1/2 Pht), 128.88, 128.17, 127.81, 127.54, 127.33, 127.20, 127.17, 126.97, 126.83, 126.80, 125.95, 125.30 (Ar), 123.46 (C-3/6 Pht), 115.98, 114.65 (C-2/6 OMp, C-3/5 OMp), 101.02 (C-1³), 98.58 (C-1⁴), 97.24 (C-1⁷), 97.14 (C-1^{4'}), 95.94 (C-1⁵; C-1^{5'}), 95.89 (C-1²), 84.54 (C-1¹), 80.45 (C-4²), 75.90 (C-3¹), 75.77 (C-2³), 75.58 (C-3³), 75.55 (C-3²), 74.73 (C-5¹), 74.59 (C-4¹), 73.33 (C-5²), 73.18 (CH₂O), 73.04 (C-2⁴), 73.03 (CH₂O), 72.63 (C-2^{4'}), 71.95 (CH₂O), 71.09 (C-5⁷), 71.04 (C-5⁵, C-5^{5'}), 70.26 (C-4³), 70.11 (C-5³), 69.52 (C-3⁵), 69.39 (C-3^{5'}), 69.04 (C-3⁴), 68.97 (C-3^{4'}), 68.88 (C-6³), 68.83 (C-3⁷), 68.59 (C-4⁷, C-6²), 68.53 (C-4^{5'}), 68.27 (C-4⁵), 67.66 (C-5⁴), 67.14 (C-5^{4'}), 66.36 (C-6¹), 64.19 (C-4⁴), 63.93 (C-4^{4'}), 61.75 (C-6^{5'}), 61.63 (C-6⁷), 61.62 (C-6⁵), 60.91 (C-6^{4'}), 60.65 (C-6⁴), 55.76 (C-2²), 54.96 (CH₃OPh), 54.22 (C-2¹), 54.19 (C-2⁷), 53.64 (C-2⁵), 53.51 (C-2^{5'}), 20.41, 20.39, 20.37, 20.34, 20.26, 20.22, 20.20, 20.13, 20.09, 20.06, 20.05, 19.93 (OAc).

*(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-4-O-acetyl- β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **50***

1.34 g (442.86 μmol) Octasaccharid **49** werden in 40 ml Acetonitril gelöst und mit 36.0 ml Toluol, 36.0 ml Wasser und 3.60 g Cer(IV)ammoniumnitrat versetzt. Die Lösung wird nach 7 Stunden Rühren bei Raumtemperatur (DC: Dichlormethan / Methanol, 20:1) mit 200 ml Essigsäureethylester verdünnt, zweimal mit 2N Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (*n*-Hexan / Aceton, 1:1; Säulendurchmesser: 40 mm, Füllhöhe: 18 cm).

Ausbeute: 1.22 g (94 %) amorph,

R_f -**49** = 0.36 (Dichlormethan / Methanol, 20:1),

R_f -**50** = 0.32 (Dichlormethan / Methanol, 20:1),

$[\alpha]_D^{23} = -12.6^\circ$ (0.4, Dichlormethan),

$C_{141}H_{146}N_8O_{61}$ (2928.69),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 2926.86$; $M_{\text{gef}} = 2927.98$ (M+H)⁺, 2950.61 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆] DMSO): $\delta = 8.07 - 6.58$ (m, 35H, Ar), 5.85 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.78$ Hz, 1H, H-3⁷), 5.70 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.66$ Hz, 1H, H-3^{5'}), 5.62 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.54$ Hz, 1H, H-3⁵), 5.55 (d, $J_{1,2} = 8.07$ Hz, 1H, H-1⁷), 5.30 – 5.19 (m, 4H, H-1⁵, H-1¹, H-1², H-1^{5'}), 5.08 – 4.92 (m, 4H, H-4⁵, H-4⁴, H-4^{5'}, H-4⁷), 4.88 – 4.70 (m, 4H, H-3⁴, H-4^{4'}, H-4³, CH₂O), 4.65 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 4.60 – 4.54 (m, 2H, H-3^{4'}, H-1⁴), 4.43 (m, 2H, 2 x CH₂O), 4.32 (d, $J_{\text{gem}} = 12.47$ Hz, 1H, CH₂O), 4.29 – 4.09 (m, 7H, H-6a⁵, H-2⁵, H-6a⁷, H-6a^{5'}, H-2⁷, H-2⁴, H-2^{5'}), 4.07 – 3.75 (m, 17H, H-1^{4'}, CH₂O, H-3¹, H-4¹, H-6b⁵, H-6b⁷, H-6b^{5'}, H-5⁵, H-3², H-5⁴, H-6a⁴, H-2², H-2^{4'}, H-2³, H-5⁷, H-5^{5'}, H-2¹), 3.67 (m, 1H, H-3³), 3.63 – 3.50 (m, 5H, H-4², CH₂O, H-6b⁴, H-6a¹, H-6a²), 3.42 – 3.16 (m, 7H, H-6a^{4'}, H-6b², H-5¹, H-6b¹, H-6b^{4'}, H-5³, H-5²), 3.03 (m, 1H, H-5^{4'}), 2.83 – 2.73 (m, 2H, H-6a³, H-6b³), 2.19, 2.10, 2.01, 1.99, 1.98, 1.98, 1.97, 1.95, 1.93, 1.91, 1.90, 1.85, 1.82, 1.81, 1.80, 1.79 (16s, 48H, OAc).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆] DMSO): $\delta = 170.21, 170.06, 170.04, 169.78, 169.72, 169.70, 169.67, 169.63, 169.29, 169.21, 169.09, 169.04, 167.25, 166.95$ (C=O), 138.16, 137.99, 137.93 (C-i Ar), 135.08, 134.96, 134.83, 134.59 (C-4/5 Pht), 131.20, 130.78, 130.65, 130.59 (C-1/2 Pht), 128.16, 127.77, 127.53, 127.47, 127.38, 127.29, 127.23, 127.11, 127.07, 126.83, 126.54, 126.32 (Ar), 123.43 (C-3/6 Pht), 100.53 (C-1³), 98.65 (C-1⁴), 97.11 (C-1^{4'}), 97.05 (C-1⁷), 95.95 (C-1²), 95.92 (C-1⁵), 95.86 (C-1^{5'}), 84.59 (C-1¹), 80.25 (C-4²), 77.05 (C-3²), 76.73 (C-5¹), 76.07 (C-3¹), 75.75 (C-3³), 75.68 (C-2³), 74.19 (C-4¹), 73.22 (CH₂O), 73.22 (C-5²), 73.12 (CH₂O), 73.00 (C-2⁴), 72.75 (C-2^{4'}), 71.87 (CH₂O), 71.05 (C-5^{5'}), 71.02 (C-5⁷), 70.99 (C-5⁵), 70.24 (C-5³), 70.20 (C-4³), 69.58 (C-3⁵), 69.39 (C-3^{5'}), 69.07 (C-3^{4'}), 69.06 (C-3⁷), 68.89 (C-3⁴), 68.76 (C-6³), 68.54 (C-4⁷), 68.49 (C-4^{5'}), 68.30 (C-4⁵), 68.29 (C-6²), 67.78 (C-5⁴), 67.17 (C-5^{4'}), 64.29 (C-4⁴), 63.98 (C-4^{4'}), 61.65 (C-6^{5'}), 61.63 (C-6⁷), 61.59 (C-6⁵), 60.97 (C-6^{4'}), 60.79 (C-6⁴), 58.57 (C-6¹), 55.74 (C-2²), 54.33 (C-2¹), 54.25 (C-2⁷), 53.60 (C-2⁵), 53.47 (C-2^{5'}) 20.97, 20.41, 20.38, 20.35, 20.26, 20.24, 20.21, 20.18, 20.14, 20.09, 19.98 (OAc).

(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-4-O-acetyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(2,3,4-tri-O-(p-methoxybenzyl)-α-L-fucopyranosyl)-(1→6)]-3-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid
52

987 mg (337 μmol) Octasaccharid **50**, 1.92 g (3.37 mmol) Ethylthiofucosid **51** und 2.40 g gepulvertes, frisch geglühtes Molekularsieb 4Å werden im Hochvakuum getrocknet, unter Argon mit 5.00 ml absolutem Dichlormethan und 3.00 ml Dimethylformamid versetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit 1.08 g (3.37 mmol) getrocknetem Tetrabutylammoniumbromid und 753 mg (3.37 mmol) Kupfer(II)bromid versetzt. Nach 3 Tagen (DC: Dichlormethan / Methanol, 20:1) wird mit Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, zweimal mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (1.: Dichlormethan / Methanol, 100:1 => 50:1; 2.: Cyclohexan / Aceton, 1:1; Säulendurchmesser: 20 mm, Füllhöhe: 18 cm).

Ausbeute: 944 mg (82 %) amorph,

R_F -**50** = 0.19 (Hexan / Aceton, 1:1),

R_F -**50** = 0.33 (Dichlormethan / Methanol, 20:1),

R_F -**52** = 0.27 (Hexan / Aceton, 1:1),

R_F -**52** = 0.41 (Dichlormethan / Methanol, 20:1),

$[\alpha]_D^{23} = -4.1^\circ$ (0.5, Dichlormethan),

$C_{171}H_{180}N_8O_{68}$ (3435.27),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 3433.09$; $M_{gef} = 3456.51$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆] DMSO): δ = 8.02 – 6.48 (m, 47H, Ar), 5.77 – 5.66 (m, 2H, H-3⁷, H-3⁵), 5.62 (dd, 1H, H-3⁵), 5.53 (d, $J_{1,2} = 7.80$ Hz, 1H, H-1⁷), 5.33 (d, $J_{1,2} = 7.80$ Hz, 1H, H-1²), 5.29 (d, $J_{1,2} = 7.80$ Hz, 1H, H-1⁵), 5.24 (d, $J_{1,2} = 8.80$ Hz, 1H, H-1⁵), 5.21 (d, $J_{1,2} = 8.80$ Hz, 1H, H-1¹), 5.10 – 4.94 (m, 3H, H-4⁵, H-4⁴, H-4⁵), 4.91 (m, 1H, H-3⁴), 4.88 – 4.62 (m, 9H, H-4⁷, H-4⁴, OCH₂, H-4³, H-1^F, OCH₂, H-1³, 2 x OCH₂), 4.62 (m, 6H, H-3⁴, OCH₂, H-1⁴, 3 x OCH₂), 4.42 – 4.23 (m, 3H, 2 x OCH₂, H-6a⁵), 4.22 – 3.09 (m, 49H, H-2⁵, H-6a⁵, H-2⁴,

H-2^{5'}, H-2⁷, H-3¹, H-6a⁷, H-4¹, H-1^{4'}, H-3², OCH₂, H-6b⁵, H-2³, H-2², H-6b^{5'}, H-5⁵, H-6b⁷, H-5^{5'}, H-2¹, H-5⁴, H-5^F, H-2^{4'}, H-6a⁴, H-3^F, OMe, H-4^F, H-4², 2 x OMe, H-2^F, H-6a², H-3³, H-5¹, H-5², H-6a¹ OCH₂, H-6b¹, H-6b², H-6b⁴, H-5⁷, H-6a^{4'}, H-6b^{4'}, H-5³), 2.92 (m, 1H, H-5^{4'}), 2.79 – 2.66 (m, 2H, H-6a³, H-6b³), 2.25 – 1.71 (16s, 48H, OAc), 1.01 (d, $J_{5,6} = 5.90$ Hz, 3H, H-6^F).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆] DMSO): δ = 170.18-169.00, 168.45-168.37 (C=O), 158.67, 158.63, 158.54 (C-4 Mpm), 137.99, 137.81, 137.78 (C-i Ar), 135.05-134.68 (C-4/5 Pht), 130.97-130.41 (C-1 Mpm, C-1/2 Pht), 129.38, 129.30, 128.77, 128.10, 127.74, 127.45, 127.41, 127.22, 127.13, 127.05, 126.87, 126.81, 126.36 (C-2/6 Mpm, Ar), 123.58-123.15 (C-3/6 Pht), 113.59, 113.52, 113.39 (C-3/5 Mpm), 101.07 (C-1³), 98.59 (C-1⁴; $J_{C-1,H-1} = 173.9$ Hz), 97.38 (C-1^F; $J_{C-1,H-1} = 170.9$ Hz), 97.24 (C-1^{4'}), 96.93 (C-1⁷), 96.29 (C-1²), 96.18 (C-1⁵), 96.06 (C-1^{5'}), 84.52 (C-1¹; $J_{C-1,H-1} = 166.8$ Hz), 80.03 (C-4²), 78.08 (C-3^F), 77.24 (C-3²), 77.12 (C-4^F), 76.27 (C-5¹), 75.99 (C-3¹), 75.28 (C-4¹), 74.85 (C-3³), 74.70 (C-2³), 73.83 (OCH₂), 73.82 (C-5²), 73.63 (C-2^F), 73.39 (C-2⁴), 73.35 (OCH₂), 73.11 (OCH₂), 72.94 (C-2^{4'}), 72.33 (OCH₂), 71.29 (C-5⁵), 71.24 (C-5^{5'}), 71.20 (OCH₂), 71.17 (C-5⁷), 70.85 (OCH₂), 70.67 (C-4³), 70.57 (C-5³), 69.83 (C-3⁵), 69.68 (C-3^{5'}), 69.33 (C-3⁷), 69.27 (C-3^{4'}), 69.10 (C-3⁴), 68.88 (C-6³), 68.81 (C-4⁷), 68.73 (C-4^{5'}), 68.55 (C-4⁵), 68.44 (C-6²), 68.03 (C-5⁴), 67.39 (C-5^{4'}), 65.99 (C-5^F), 65.31 (C-6¹), 64.50 (C-4⁴), 64.20 (C-4^{4'}), 62.04 (C-6⁷), 61.98 (C-6^{5'}), 61.77 (C-6⁵), 61.20 (C-6^{4'}), 60.95 (C-6⁴), 55.91 (C-2²), 54.96 (OMe), 54.92 (OMe), 54.80 (OMe), 54.71 (C-2⁷), 54.54 (C-2¹), 53.85 (C-2⁵), 53.73 (C-2^{5'}), 20.45, 20.41, 20.39, 20.38, 20.36, 20.34, 20.24, 20.21, 20.18, 20.14, 20.11, 20.09, 20.06, 20.04, 19.92, 19.91 (16 OAc), 16.28 (C-6^F).

8.7 Versuche zu Kapitel 3.1.4

(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-4-O-acetyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(α-L-fucopyranosyl)-(1→6)]-3-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid 53

630 mg (183.4 μmol) Nonasaccharid **52** werden in 19.5 ml Acetonitril und 2.2 ml Wasser gelöst und 30 Minuten im Eisbad gerührt. Nach Zugabe von 850 mg (1.55 mmol) Cer(IV)ammoniumnitrat wird weiter unter Kühlung bei 0°C gerührt. Nach 3 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 20:1) wird mit 60 ml Acetonitril verdünnt, der Kolben in flüssigem Stickstoff gekühlt und der Inhalt lyophilisiert. Der gelbe, feste Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, einmal mit 1N Salzsäure gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Cyclohexan / Aceton, 1:1; Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 11 cm).

Ausbeute: 398 mg (71 %) amorph,

R_F -**52** = 0.52 (Dichlormethan / Methanol, 20:1),

R_F -**53** = 0.32 (Dichlormethan / Methanol, 20:1),

$[\alpha]_D^{23} = -0.8^\circ$ (0.6, Dichlormethan),

$\text{C}_{147}\text{H}_{156}\text{N}_8\text{O}_{65}$ (3074.83),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 3072.91$; $M_{\text{gef}} = 3074.60$ (M+H)⁺, 3097.05 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆] DMSO): $\delta = 8.00 - 6.64$ (m, 35H, Ar), 5.90 (dd, 1H, H-3⁷), 5.71 (dd, 1H, H-3⁵), 5.63 – 5.54 (m, 2H, H-3⁵, H-1⁷), 5.30 – 5.20 (m, 4H, H-1⁵, H-1², H-1⁵, H-1¹), 5.05 – 4.92 (m, 4H, H-4⁵, H-4⁴, H-4⁵, H-4⁷), 4.88 – 4.60 (m, 7H, H-3⁴, H-4⁴, OCH₂, H-4³, H-1³, H-1^F, H-3⁴), 4.57 – 3.21 (m, 45H, H-1⁴, OCH₂, H-6a⁵, H-6a⁷, H-6a⁵, H-2⁵, H-4¹, H-2⁴, H-2⁷, H-2⁵, H-1⁴, H-3¹, H-6b⁷, H-6b⁵, H-6b⁵, H-3², H-5⁵, H-2³, H-5⁵, H-5⁴, H-2², H-6a⁴, H-2¹, H-5⁷, H-2⁴, H-5^F, H-4², H-6a², H-3³, H-5², H-4^F, H-6a¹, H-5¹, H-3^F, H-6b², H-6b⁴, H-2^F, H-6a⁴, H-6b¹, H-6b⁴, H-5³), 2.95 (m, 1H, H-5⁴), 2.78 – 2.65 (m, 2H, H-6a³, H-6b³), 2.20 – 1.75 (16s, 48H, OAc), 1.04 (d, $J_{5,6} = 5.72$ Hz, 3H, H-6^F).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆] DMSO): $\delta = 170.21 - 168.98$ (C=O), 138.13, 137.99, 137.89 (C-i Ar), 135.08 - 134.69 (C-4/5 Pht), 130.89 - 130.20 (C-1/2 Pht), 128.13, 127.76, 127.60, 127.54, 127.37, 127.18, 127.11, 126.99, 126.81, 126.18 (C-2/6, Ar), 123.69 - 123.10 (C-3/6 Pht), 101.26 (C-1³), 99.00 (C-1^F), 98.48 (C-1⁴), 96.99 (C-1⁴), 96.76 (C-1⁷), 95.99 (C-1⁵), 95.98 (C-1²), 95.74, (C-1⁵), 84.22 (C-1¹), 80.62 (C-4²), 77.42 (C-3²), 75.91 (C-3¹), 75.58 (C-3³), 75.56 (C-5¹), 74.92 (C-2³), 74.60 (C-4¹), 73.15 (OCH₂), 73.12 (C-5²), 73.11 (OCH₂), 73.08 (C-2⁴), 72.70 (C-2⁴), 71.95 (OCH₂), 71.13 (C-2^F), 71.02 (C-5⁵), 70.99 (C-5⁷), 70.95 (C-5⁵), 70.18 (C-5³), 70.11 (C-4³), 69.61 (C-3⁵), 69.41 (C-3^F), 69.33 (C-3⁵), 69.06 (C-3⁷), 69.04

(C-3⁴), 68.98 (C-3^{4'}), 68.72 (C-6³), 68.65 (C-4⁷), 68.42 (C-4^{5'}), 68.28 (C-4⁵), 68.13 (C-6²), 67.86 (C-4^F), 67.67 (C-5⁴), 67.08 (C-5^{4'}), 65.70 (C-5^F), 64.67 (C-6¹), 64.26 (C-4⁴), 64.07 (C-4^{4'}), 61.80 (C-6⁷), 61.69 (C-6^{5'}), 61.57 (C-6⁵), 61.03 (C-6^{4'}), 60.64 (C-6⁴), 55.79 (C-2²), 54.42 (C-2⁷), 54.28 (C-2¹), 53.59 (C-2⁵), 53.57 (C-2^{5'}), 20.45, 20.42, 20.40, 20.39, 20.37, 20.35, 20.30, 20.27, 20.24, 20.18, 20.17, 20.14, 20.13, 20.08, 19.93 (16 OAc), 16.44 (C-6^F).

*(2-Acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-(2-acetamido-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(α-L-fucopyranosyl)-(1→6)]-2-acetamido-3-O-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosylazid **54***

1. Dephthaloylierung

323 mg (105 μmol) Nonasaccharid **53** werden in 6.8 ml *n*-Butanol und 1.6 ml Ethylendiamin bei 80°C gerührt. Nach 26 Stunden (DC: *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1) wird bei 50°C Wasserbadtemperatur eingengt, dreimal mit je 10 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

R_f = 0.26 (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1)

2. Peracetylierung

Der Rückstand aus 1. wird mit 16.0 ml Pyridin und 8.0 ml Essigsäureanhydrid bei 50°C für 2 Stunden gerührt (DC: *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1). Anschließend wird eingengt, dreimal mit je 20 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

R_f = 0.91 (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1)

3. Deacetylierung

Der Rückstand aus 2. wird in 18 ml Methylaminlösung (40 % in Wasser) gelöst und 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (DC: *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1). Die Lösung wird eingengt, dreimal mit je 20 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Der feste, ölige Rückstand wird in Wasser gelöst und lyophilisiert. Zur Reinigung wird der Rückstand (911 mg ungereinigt) in 60 ml Wasser gelöst und jeweils 10 ml dieser Lösung mit einer Kunststoffspritze durch 3 miteinander verbundene SepPak-Kartuschen gedrückt. Die Trennung erfolgt durch einen Acetonitril / Wasser-Gradienten: man wäscht mit

je dreimal 10 ml Wasser, dreimal 10 ml 5 %, dreimal 10 ml 10 %, dreimal 10 ml 15 %, zweimal 10 ml 20 % Acetonitril (in Wasser) und zweimal 10 ml 100 % Acetonitril. Das Produkt eluiert bei 15 % Acetonitril in Wasser; diese Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 198 mg (96 %) amorph,

$R_f = 0.50$ (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1),

$[\alpha]_D^{23} = -37.0^\circ$ (0.8, H₂O),

C₈₅H₁₂₄N₈O₄₄ (1961.92),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 1960.77$; $M_{\text{gef}} = 1962.07$ (M+H)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O (mit [D₆]-DMSO als internem Standard)): $\delta = 7.35 - 7.07$ (m, 15H, Ar), 4.94 – 4.90 (m, 2H, H-1⁴, OCH₂), 4.73 – 4.68 (m, 3H, H-1^F, H-1⁷, OCH₂), 4.51 – 4.43 (m, 5H, H-1^{4'}, H-1², H-1³, H-1¹, OCH₂), 4.35 – 4.32 (m, 2H, OCH₂, H-1⁵), 4.23 – 4.14 (m, 3H, OCH₂, H-2³), 3.98 – 3.96 (m, 2H, H-1^{5'}, H-2⁴), 3.87 (m, 1H, H-5^F), 3.82 – 3.78 (m, 2H, H-4¹, H-6a³), 3.72 – 3.12 (m, 46H, H-6a⁵, H-5⁴, H-6a⁴, H-6a⁷, H-3⁴, H-6a¹, H-4², H-2², H-3², H-4³, H-2¹, H-6a², H-2^F, H-3^F, H-6b⁷, H-6a^{4'}, H-2^{4'}, H-6b⁴, H-6b⁵, H-3^{4'}, H-2⁷, H-2⁵, H-6b³, H-3¹, H-3³, H-4^F, H-5¹, H-6b¹, H-6a^{5'}, H-5², H-2^{5'}, H-6b^{4'}, H-6b², H-3⁷, H-3⁵, H-4⁴, H-5^{4'}, H-6b^{5'}, H-4⁷, H-3^{5'}, H-4^{4'}, H-5⁵, H-4^{5'}, H-4⁵, H-5³, H-5⁷), 2.63 (m, 1H, H-5^{5'}), 1.85, 1.84, 1.69, 1.61, 1.60 (5s, 15H, NAc), 1.00 (d, $J_{5,6} = 5.97$ Hz, 3H, H-6^F).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O (mit [D₆] DMSO als internem Standard)): $\delta = 176.26, 176.20, 175.73, 175.56, 175.34$ (C=O), 139.72, 139.59, 138.69 (C-i Ar), 130.41 – 129.43 (Ar), 103.57 (C-1³), 102.07 (C-1²), 101.85 (C-1⁷), 101.33 (C-1⁵), 100.79 (C-1^F), 100.52 (C-1^{5'}), 100.39 (C-1⁴), 97.45 (C-1^{4'}), 90.12 (C-1¹), 82.60 (C-3²), 81.64 (C-3¹), 80.71 (C-4²), 78.97 (C-3³), 77.96 (C-2⁴), 77.45 (C-5⁷), 77.32 (C-2^{4'}), 77.20 (C-4¹), 77.19 (C-5¹), 77.18 (C-5⁵), 76.66 (C-5^{5'}), 75.68 (C-5³), 75.64 (C-2³), 75.60 (OCH₂), 75.50 (OCH₂), 75.31 (C-5²), 74.78 (C-5⁴), 74.68 (C-3⁷), 74.68 (C-3⁵), 74.53 (OCH₂), 74.47 (C-3^{5'}), 73.99 (C-5^{4'}), 73.10 (C-4^F), 71.18 (C-4⁷), 70.87 (C-3^F), 70.82 (C-3⁴), 70.78 (C-4⁵), 70.78 (C-3^{4'}), 70.69 (C-4^{5'}), 70.08 (C-6⁴), 69.43 (C-2^F), 68.57 (C-4^{4'}), 68.48 (C-4⁴), 68.20 (C-5^F), 67.82 (C-6⁴), 67.28 (C-4³), 66.57 (C-6³), 62.79 (C-6²), 62.78 (C-6¹), 61.89 (C-6⁵), 61.76 (C-6⁷), 61.34 (C-6^{5'}), 57.26 (C-2⁷), 56.75 (C-2⁵), 56.71 (C-2^{5'}), 56.36 (C-2²), 55.35 (C-2¹), 24.22, 23.83, 23.77, 23.54, 23.49 (NAc), 16.77 (C-6^F).

*N*¹-(6-Benzoyloxycarbonyl-6-aminohexanoylamido)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-[(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]- β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-3-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid
56

1. Azidreduktion

42.8 mg (21.8 μ mol) Nonasaccharid **54** werden unter Argon in 3 ml absolutem Methanol gelöst, mit 50 μ l Triethylamin und 150 μ l Propandithiol versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 60 min. (DC: i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1) werden weitere 50 μ l Triethylamin und 100 μ l Propandithiol zugegeben. Nach 4 Stunden (DC: i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1) wird am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet (1 h). Man erhält einen farblosen Feststoff.

2. Herstellung der Kupplungslösung

236 mg (0.89 mmol) Z-Aminohexansäure **55** werden in 3.5 ml NMP (über Molekularsieb 4Å getrocknet) unter Argon gelöst. Die klare Lösung wird mit 136 mg (0.89 mmol) HOBt und 285 mg (0.89 mmol) TBTU versetzt und mit 450 μ l DIPEA auf pH 9 eingestellt.

3. Kupplung des Aminosuckers mit Z-Aminohexansäure

Zu dem farblosen Feststoff aus 1. werden 2.5 ml der Kupplungslösung gegeben. Die Dünnschichtchromatographie der klaren Lösung (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1) zeigt nach 2 min schon vollständigen Umsatz; nach 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Methylamin (41 % in H₂O) abgebrochen, am Rotationsverdampfer bei 50°C eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Um das restliche NMP zu entfernen, wird mit 20 ml eines Acetonitril : Wasser-Gemischs (20 : 80 Vol. %) verdünnt, eingefroren und im Hochvakuum lyophilisiert. Nach dreimaligem Verdünnen und Lyophilisieren werden 450 mg eines beigen Feststoffs erhalten. Der Feststoff wird in 10 ml Wasser suspendiert, 5 Minuten im Ultraschallbad belassen, zentrifugiert und die überstehende klare Lösung abgetrennt und lyophilisiert; der Rückstand wird verworfen. Der nach Gefriertrocknen erhaltene Rückstand wird in 1 ml eines Acetonitril : Wasser-Gemischs (20 : 80) aufgenommen, zentrifugiert, auf 450 μ l eingeengt und durch RP-HPLC (Waters, Acetonitril / Wasser, 35-45 % Acetonitril in

40 Minuten; Fluß = 8 ml /min, Macherey-Nagel Nucleogel RP 100-10 (300 x 25 mm)) gereinigt.

Ausbeute: 14.7 mg (31 %) amorpher farbloser Feststoff,

$R_f = 0.8$ (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1),

$[\alpha]_D^{25} = -22.7^\circ$ (1.0, H₂O),

C₉₉H₁₄₃N₇O₄₇ (2183.21),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 2181.90$; $M_{\text{gef}} = 2204.60$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O (mit [D₆]-DMSO als internem Standard)): $\delta = 7.29 - 7.07$ (m, 20H, Ar), 4.94 – 4.89 (m, 4H, H-1⁴, OCH₂), 4.78 (d, $J_{1,2} = 9.63$ Hz, 1H, H-1¹), 4.74 – 4.59 (m, 4H, OCH₂, H-1⁷, H-1^F, H-1^{4'}), 4.53 – 4.48 (m, 2H, H-1², H-1³), 4.42 (d, $J_{\text{gem}} = 12.03$ Hz, OCH₂), 4.35 – 4.30 (m, 2H, OCH₂, H-1⁵), 4.26 (d, $J_{\text{gem}} = 11.48$ Hz, OCH₂), 4.20 (d, $J_{\text{gem}} = 11.48$ Hz, OCH₂), 4.13 (s, 1H, H-2³), 4.01 – 3.94 (m, 2H, H-1^{5'}, H-2⁴), 3.88 (m, 1H, H-5^F), 3.81 (m, 1H, H-6a³), 3.76 – 3.19 (m, 45H, H-4¹, H-6a⁵, H-5⁴, H-2¹, H-6a⁷, H-6a⁴, H-4², H-3², H-3⁴, H-2², H-6a¹, H-4³, H-6a², H-6a^{4'}, H-3^F, H-2^F, H-2a^{4'}, H-6b⁷, H-3^{4'}, H-6b⁵, H-6b⁴, H-2⁷, H-2⁵, H-3¹, H-4^F, H-6b³, H-3³, H-6b¹, H-6a^{5'}, H-6b^{4'}, H-5², H-6b², H-5¹, H-2^{5'}, H-3⁷, H-5^{4'}, H-3⁵, H-4⁴, H-6b^{5'}, H-3^{5'}, H-4⁷, H-4^{4'}, H-4⁵, H-5⁵, H-4^{5'}), 3.17 – 3.08 (m, 2H, H-5³, H-5⁷), 2.89 (m, 2H, ϵ -CH₂), 2.66 (m, 1H, H-5^{5'}), 2.02 (m, 2H, α -CH₂), 1.85, 1.83, 1.67, 1.62, 1.49 (5 s, 15H, NAc), 1.34 (m, 2H, β -CH₂), 1.26 (m, 2H, δ -CH₂), 1.03 (m, 2H, γ -CH₂), 0.97 (d, $J_{5,6} = 5.95$ Hz, 3H, H-6^F).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O (mit [D₆] DMSO als internem Standard)): $\delta = 178.88$, 176.10, 176.03, 176.01, 175.31, 175.21 (C=O), 139.94, 138.86 (C-i Ar), 130.38, 130.15, 129.89, 129.70, 129.48, 129.30 (Ar), 103.24 (C-1³), 101.74 (C-1²), 101.57 (C-1⁷), 101.17 (C-1⁵), 100.53 (C-1^F), 100.35 (C-1^{5'}), 100.29 (C-1⁴), 97.35 (C-1^{4'}), 82.33 (C-3²), 82.32 (C-3¹), 80.63 (C-4²), 79.47 (C-1¹), 78.80 (C-3³), 77.98 (C-2⁴), 77.44 (C-5⁷), 77.40 (C-4¹), 77.27 (C-2^{4'}), 77.10 (C-5⁵), 76.95 (C-5¹), 76.66 (C-5^{5'}), 75.67 (C-5³), 75.60 (C-2³), 75.50 (OCH₂), 75.40 (OCH₂), 75.24 (C-5²), 74.69 (C-5⁴), 74.66 (C-3⁷), 74.59 (C-3⁵), 74.42 (OCH₂), 74.30 (C-3^{5'}), 73.99 (C-5^{4'}), 73.03 (C-4^F), 71.21 (C-4⁷), 71.18 (C-4⁵), 70.83 (C-3^F), 70.75 (C-4^{5'}), 70.72 (C-3⁴), 70.67 (C-3^{4'}), 70.11 (C-6^{4'}), 69.44 (C-2^F), 68.45 (C-4^{4'}), 68.38 (C-4⁴), 68.04 (C-6⁴), 67.96 (C-5^F), 67.79 (OCH₂), 67.19 (C-4³), 66.53 (C-6³), 62.72 (C-6²), 62.70 (C-6¹), 61.87 (C-6⁵), 61.71 (C-6⁷), 61.34 (C-6^{5'}), 57.25 (C-2⁷), 56.72 (C-2^{5'}), 56.63 (C-2⁵), 56.22 (C-2²), 54.47 (C-

²¹), 41.46 (C-6 AH), 36.87 (C-2 AH), 29.74 (C-5 AH), 26.40 (C-4 AH), 25.97 (C-3 AH), 24.30, 23.99, 23.98, 23.94, 23.53 (NAc), 16.81 (C-6^F).

*N*¹-(6-Aminohexanoylamido)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(α-L-fucopyranosyl)-(1→6)]-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid **57**

14.5 mg (6.64 μmol) Nonasaccharid **56** werden unter Argon in 6 ml absolutem Methanol gelöst, mit 325 μl Essigsäure und 43 mg PdO·H₂O (puriss., Fluka) versetzt und unter H₂-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden (DC: i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1) wird zentrifugiert und der Katalysator-Rückstand dreimal mit je 50 μl Essigsäure in 5 ml Methanol gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden bei 40°C auf ca. ein Viertel des ursprünglichen Volumens eingeeengt, eingefroren und lyophilisiert. Das Rohprodukt (16 mg) wird durch Gelfiltration gereinigt (Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm); Eluens: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss 0.75 ml / min; Detektion: 220 und 254 nm).

Ausbeute: 11.2 mg (95 %) amorpher farbloser Feststoff,

R_f = 0.24 (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1),

[α]_D²⁵ = -18.6° (1.1, H₂O),

C₇₀H₁₁₉N₇O₄₅ (1778.71),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 1777.72; M_{gef} = 1778.8 (M+H)⁺, 1800.8 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O (mit [D₆]-DMSO als internem Standard)): δ = 4.92 (d, J_{1,2} < 1.0 Hz, 1H, H-1⁴), 4.84 (d, J_{1,2} = 9.7 Hz, 1H, H-1¹), 4.70 (d, J_{1,2} < 1.0 Hz, 1H, H-1⁴), 4.68 (d, J_{1,2} = 3.2 Hz, 1H, H-1^F), 4.58 (d, J_{1,2} < 1.0 Hz, 1H, H-1³), 4.52 (d, J_{1,2} = 8.4 Hz, 1H, H-1²), 4.50 (d, J_{1,2} = 8.4 Hz, 1H, H-1⁷), 4.34 (d, J_{1,2} = 8.4 Hz, 1H, H-1⁵), 4.30 (d, J_{1,2} = 8.4 Hz, 1H, H-1⁵), 4.18 (m, 1H, H-2³), 3.97 – 3.91 (m, 2H, H-2⁴, H-5^F), 3.87 (m, 1H, H-2⁴), 3.79 – 3.19 (m, 47H, H-5⁴, H-6a⁴, H-6a⁵, H-6a⁵, H-6a⁷, H-3⁴, H-6a⁴, H-6a¹, H-6a², H-3^F, H-3², H-2¹, H-3⁴, H-6a³, H-3³, H-6b³, H-2^F, H-4^F, H-6b⁵, H-6b⁵, H-6b⁷, H-3¹, H-4¹, H-2², H-6b², H-5¹, H-6b¹, H-2⁵, H-2⁷, H-2⁵, H-5², H-4³, H-6b⁴, H-5³, H-6b⁴, H-4², H-3⁵, H-3⁷, H-3⁵, H-5⁴, H-4⁴, H-4⁴,

H-4^{5'}, H-4⁷, H-5^{5'}, H-4⁵, H-5⁵), 3.13 (m, 1H, H-5⁷), 2.70 (t, $J_{\delta,\epsilon} = 7.1$ Hz, 2H, ϵ -CH₂), 2.08 (t, $J_{\alpha,\beta} = 7.1$ Hz, 2H, α -CH₂), 1.89, 1.85, 1.84, 1.83, 1.80 (5s, 15H, NAc), 1.46 – 1.36 (m, 4H, δ -CH₂, β -CH₂), 1.14 (m, 2H, γ -CH₂), 1.01 (d, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, 3H, H-6^F).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O (mit [D₆] DMSO als internem Standard)): $\delta = 178.35, 175.70, 175.65, 175.59, 175.52, 174.91$ (C=O), 102.74 (C-1³), 102.36 (C-1⁷), 102.04 (C-1²), 101.02 (C-1⁵), 100.94 (C-1^{5'}), 100.70 (C-1^F), 100.32 (C-1⁴), 98.29 (C-1^{4'}), 82.72 (C-4²), 80.23 (C-4¹), 79.63 (C-1¹), 78.61 (C-3³), 77.86 (C-2⁴, C-2^{4'}), 77.28 (C-5⁷), 77.16 (C-5^{5'}, C-5⁵), 76.42 (C-5¹), 76.28 (C-2³), 75.68 (C-5³), 75.47 (C-5²), 74.70 (C-5⁴), 74.55 (C-3^{5'}), 74.52 (C-3⁷), 74.49 (C-3⁵), 74.23 (C-5^{4'}), 73.86 (C-3¹), 73.19 (C-3²), 73.09 (C-4^F), 71.20 (C-4⁷), 71.18 (C-4^{5'}, C-4⁵), 70.82 (C-3^F), 70.74 (C-3⁴), 70.61 (C-3^{4'}), 69.45 (C-2^F), 68.64 (C-4⁴), 68.55 (C-4^{4'}), 68.09 (C-6³), 68.04 (C-6¹), 67.96 (C-5^F), 67.88 (C-4³), 62.92 (C-6⁴), 62.72 (C-6^{4'}), 61.87 (C-6^{5'}), 61.83 (C-6⁵), 61.68 (C-6⁷), 61.37 (C-6²), 56.96 (C-2⁷), 56.70 (C-2^{5'}), 56.64 (C-2⁵), 56.34 (C-2²), 55.12 (C-2¹), 40.69 (C-6 AH), 36.77 (C-2 AH), 28.75 (C-5 AH), 26.36 (C-4 AH), 25.85 (C-3 AH), 23.87, 23.71, 23.38 (NAc), 16.80 (C-6^F).

8.8 Versuche zu Kapitel 3.2

*β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]- β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **59***

5.5 mg (2.80 μ mol) Nonasaccharid **54** werden in 1.4 ml 20 mM Natriumkacodylatpuffer pH 7.4 gelöst. Der Puffer enthält 1.0 mg Rinderserumalbumin, 2.5 μ mol NaN₃, 1.4 μ mol MnCl₂, 5.6 mg (8.4 μ mol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 6 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 120 mU N-Acetylglucosamin- β -1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach vollständiger Reaktion (DC: i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1) wird lyophilisiert, in 1 ml Wasser aufgenommen, der Niederschlag abzentrifugiert und der klare Überstand durch Gelfiltration

gereinigt (Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm); Eluens: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss 0.75 ml / min; Detektion: 214, 254 und 280 nm).

Ausbeute: 4.6 mg (72 %) amorpher farbloser Feststoff,

$R_f = 0.64$ (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1),

$C_{103}H_{154}N_8O_{59}$ (2448.34),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 2446.93$; $M_{gef} = 1143.69$ ($M(2 \times Gal)+2H$)²⁺, 1224.91 ($M(3 \times Gal)+2H$)²⁺.

*N*¹-(6-Aminohexanoylamido)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-[(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(α-L-fucopyranosyl)-(1→6)]-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid **61**

11.2 mg (6.30 μmol) Nonasaccharid **57** werden in 4.5 ml 20 mM Natriumkacodylatpuffer pH 7.4 gelöst. Der Puffer enthält 3.4 mg Rinderserumalbumin, 8.43 μmol NaN₃, 4.70 μmol MnCl₂, 3.84 mg (6.30 μmol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 13 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 270 mU *N*-Acetylglucosamin-β-1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach vollständiger Reaktion (DC: i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1) wird lyophilisiert, in 1 ml Wasser aufgenommen, der Niederschlag abzentrifugiert und der klare Überstand durch Gelfiltration gereinigt (Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm); Eluens: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss 0.75 ml / min; Detektion: 214, 254 und 280 nm).

Ausbeute: 9.7 mg (80 %) amorpher farbloser Feststoff,

$R_f = 0.18$ (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1),

$[\alpha]_D^{22} = -19.9^\circ$ (0.2, H₂O),

$C_{76}H_{129}N_7O_{50}$ (1940.85),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1939.78$; $M_{gef} = 970.85$ ($M+2H$)²⁺, 981.84 ($M+H+Na$)²⁺.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O (mit [D₆]-DMSO als internem Standard)): $\delta = 4.93$ (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.84 (d, $J_{1,2} = 9.3$ Hz, 1H, H-1¹), 4.70 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.68 (d, $J_{1,2} =$

3.3 Hz, 1H, H-1^F), 4.57 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1³), 4.52 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1²), 4.50 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1⁷), 4.34 (m, 2H, H-1^{5'}, H-1⁵), 4.26 (d, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 1H, H-1⁶), 4.18 (m, 1H, H-2³), 3.97 – 3.90 (m, 2H, H-2⁴, H-5^F), 3.88 (m, 1H, H-2^{4'}), 3.79 – 3.18 (m, 53H, H-6a⁵, H-5⁴, H-6a⁴, H-4⁶, H-6a^{5'}, H-6a⁷, H-3^{4'}, H-6a¹, H-6a^{4'}, H-6a², H-3^F, H-3⁴, H-3², H-2¹, H-6b⁵, H-6a³, H-3³, H-6b³, H-2^F, H-4^F, H-6b^{5'}, H-6b⁷, H-3¹, H-4¹, H-6a⁶, H-6b², H-2⁵, H-6b⁶, H-2², H-3⁵, H-5⁶, H-5¹, H-6b¹, H-4⁵, H-2⁷, H-2^{5'}, H-4³, H-5², H-3⁶, H-6b^{4'}, H-6b⁴, H-4², H-5³, H-5⁵, H-3⁷, H-5^{4'}, H-3^{5'}, H-2⁶, H-4^{4'}, H-4⁴, H-4^{5'}, H-4⁷, H-5^{5'}), 3.13 (m, 1H, H-5⁷), 2.68 (t, $J_{\delta,\epsilon} = 7.1$ Hz, 2H, ϵ -CH₂), 2.08 (t, $J_{\alpha,\beta} = 6.6$ Hz, 2H, α -CH₂), 1.89, 1.85, 1.84, 1.83, 1.80 (5s, 15H, NAc), 1.46 – 1.36 (m, 4H, δ -CH₂, β -CH₂), 1.14 (m, 2H, γ -CH₂), 1.01 (d, $J_{5,6} = 6.6$ Hz, 3H, H-6^F).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O (mit [D₆] DMSO als internem Standard)): δ = 178.77, 176.10 - 175.85 (C=O), 104.22 (C-1⁶), 102.80 (C-1³), 102.36 (C-1⁷), 102.06 (C-1²), 101.02 (C-1^{5'}), 100.94 (C-1⁵), 100.67 (C-1^F), 100.45 (C-1⁴), 98.48 (C-1^{4'}), 82.76 (C-4²), 80.11 (C-4¹), 80.00 (C-4⁵), 79.59 (C-1¹), 78.62 (C-3³), 77.85 (C-2⁴), 77.81 (C-2⁴), 77.25 (C-5⁷), 77.15 (C-5^{5'}), 76.47 (C-5⁶), 76.43 (C-5¹), 76.41 (C-2³), 76.06 (C-5⁵), 75.68 (C-5³), 75.52 (C-5²), 74.74 (C-5⁴), 74.55 (C-3⁷), 74.49 (C-3^{5'}), 74.30 (C-5^{4'}), 73.91 (C-3¹), 73.84 (C-3⁶), 73.22 (C-3²), 73.19 (C-3⁵), 73.12 (C-4^F), 72.23 (C-2⁶), 71.20 (C-4^{5'}), 71.18 (C-4⁷), 70.85 (C-3^F), 70.73 (C-3⁴), 70.66 (C-3^{4'}), 69.79 (C-4⁶), 69.45 (C-2^F), 68.60 (C-4⁴), 68.53 (C-4^{4'}), 68.08 (C-6³), 68.08 (C-5^F), 68.08 (C-6¹), 67.93 (C-4³), 63.01 (C-6⁴), 62.69 (C-6^{4'}), 62.22 (C-6⁶), 61.96 (C-6^{5'}), 61.70 (C-6⁷), 61.42 (C-6²), 61.28 (C-6⁵), 57.00 (C-2⁷), 56.76 (C-2^{5'}), 56.50 (C-2²), 56.19 (C-2⁵), 55.06 (C-2¹), 40.79 (C-6 AH), 36.83 (C-2 AH), 29.01 (C-5 AH), 26.37 (C-4 AH), 25.82 (C-3 AH), 24.00 - 23.90 (NAc), 16.76 (C-6^F).

*N*¹-(6-Aminohexanoylamido)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]- β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid **62**

14.0 mg (7.21 μ mol) Decasaccharid **61** werden in 5.2 ml 20 mM Natriumkacodylatpuffer pH 7.4 gelöst. Der Puffer enthält 3.85 mg Rinderserumalbumin, 9.65 μ mol NaN₃, 5.40 μ mol

MnCl₂, 4.40 mg (7.21 µmol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 15 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 310 mU *N*-Acetylglucosamin-β-1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 60 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach vollständiger Reaktion (DC: i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1; zusätzlich ESI-MS) wird lyophilisiert, in 1 ml Wasser aufgenommen, der Niederschlag zentrifugiert und der klare Überstand durch Gelfiltration gereinigt (Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm); Eluens: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss 0.75 ml / min; Detektion: 214, 254 und 280 nm). Bei der massenspektroskopischen Untersuchung wird ein geringer Anteil an 3-fach galactosyliertem Produkt (Überreaktion) gefunden, der durch Gelfiltration nicht abtrennbar ist.

Ausbeute: 12.7 mg (84 %) amorpher farbloser Feststoff,

$R_f = 0.12$ (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1),

$[\alpha]_D^{22} = -18.6^\circ$ (0.2, H₂O),

C₈₂H₁₃₉N₇O₅₅ (2103.00),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 2101.83$; $M_{\text{gef}} = 1073.87$ (M+2Na)²⁺, 1154.86 (M+Galactose +2Na)²⁺.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O (mit [D₆]-DMSO als internem Standard)): $\delta = 4.93$ (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.84 (d, $J_{1,2} = 9.6$ Hz, 1H, H-1¹), 4.70 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1^{4'}), 4.68 (d, $J_{1,2} = 3.2$ Hz, 1H, H-1^F), 4.58 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1³), 4.53 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1²), 4.50 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1⁷), 4.35 (m, 2H, H-1^{5'}, H-1⁵), 4.27 (m, 2H, H-1⁶, H-1^{6'}), 4.19 (m, 1H, H-2³), 3.98 – 3.86 (m, 3H, H-2⁴, H-5^F, H-2^{4'}), 3.82 – 3.22 (m, 59H, H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-6a², H-5⁴, H-4⁶, H-4^{6'}, H-6a⁴, H-6a⁷, H-3^{4'}, H-6a^{4'}, H-6a¹, H-3^F, H-3⁴, H-6b⁵, H-6b^{5'}, H-2¹, H-3², H-3³, H-6b², H-6a³, H-6b³, H-2^F, H-4^F, H-6b⁷, H-3¹, H-6a⁶, H-6a^{6'}, H-4¹, H-5¹, H-6b⁶, H-6b^{6'}, H-2², H-2⁵, H-2^{5'}, H-3⁵, H-3^{5'}, H-5⁶, H-5^{6'}, H-6b¹, H-4⁵, H-4^{5'}, H-2⁷, H-4³, H-5², H-3⁶, H-3^{6'}, H-5³, H-6b⁴, H-6b^{4'}, H-4², H-5⁵, H-5^{5'}, H-5^{4'}, H-3⁷, H-2⁶, H-2^{6'}, H-4⁴, H-4^{4'}, H-4⁷), 3.14 (m, 1H, H-5⁷), 2.76 (t, $J_{\delta,\epsilon} = 7.3$ Hz, 2H, ϵ -CH₂), 2.08 (t, $J_{\alpha,\beta} = 6.3$ Hz, 2H, α -CH₂), 1.89, 1.85, 1.84, 1.83, 1.80 (5s, 15H, NAc), 1.46 – 1.36 (m, 4H, δ -CH₂, β -CH₂), 1.15 (m, 2H, γ -CH₂), 1.01 (d, $J_{5,6} = 6.3$ Hz, 3H, H-6^F).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O (mit [D₆] DMSO als internem Standard)): $\delta = 178.85$, 176.14 - 175.82 (C=O), 104.22 (C-1⁶, C-1^{6'}), 102.77 (C-1³), 102.31 (C-1⁷), 102.09 (C-1²), 100.90 (C-1⁵), 100.81 (C-1^{5'}), 100.72 (C-1^F), 100.38 (C-1⁴), 98.36 (C-1^{4'}), 82.70 (C-4²), 80.14 (C-4¹),

79.96 (C-4⁵, C-4^{5'}), 79.58 (C-1¹), 78.69 (C-3³), 77.83 (C-2⁴), 77.78 (C-2⁴), 77.25 (C-5⁷), 76.55 (C-5⁶, C-5^{6'}), 76.38 (C-5¹, C-2³), 76.01 (C-5⁵, C-5^{5'}), 75.62 (C-5³), 75.45 (C-5²), 74.67 (C-5⁴), 74.53 (C-3⁷), 74.29 (C-5^{4'}), 73.91 (C-3¹), 73.84 (C-3⁶, C-3^{6'}), 73.21 (C-3²), 73.18 (C-3⁵, C-3^{5'}), 73.11 (C-4^F), 72.28 (C-2⁶, C-2^{6'}), 71.19 (C-4⁷), 70.83 (C-3^F), 70.73 (C-3⁴), 70.62 (C-3^{4'}), 69.78 (C-4⁶, C-4^{6'}), 69.48 (C-2^F), 68.59 (C-4⁴, C-4^{4'}), 68.06 (C-6¹, C-6³), 68.00 (C-5^F), 67.89 (C-4³), 62.86 (C-6⁴), 62.74 (C-6^{4'}), 62.18 (C-6⁶, C-6^{6'}), 61.69 (C-6⁷), 61.24 (C-6⁵, C-6^{5'}), 60.95 (C-6²), 56.89 (C-2⁷), 56.40 (C-2²), 56.26 (C-2⁵, C-2^{5'}), 55.05 (C-2¹), 40.53 (C-6 AH), 36.70 (C-2 AH), 28.00 (C-5 AH), 26.26 (C-4 AH), 25.68 (C-3 AH), 23.90 - 23.70 (NAc), 16.77 (C-6^F).

*N*¹-(6-Aminohexanoylamido)-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)]-[(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(α-L-fucopyranosyl)-(1→6)]-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid **63**

10.0 mg (4.75 μmol) Undecasaccharid **62** werden in 3.5 ml 20 mM Natriumkacodylatpuffer pH 7.4 gelöst. Der Puffer enthält 2.54 mg Rinderserumalbumin, 6.36 μmol NaN₃, 3.60 μmol MnCl₂, 7.25 mg (11.88 μmol) Uridin-5'-diphosphogalactose, 10 U alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 205 mU *N*-Acetylglucosamin-β-1,4-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22). Die Reaktionsmischung wird 60 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach vollständiger Reaktion (DC: i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1; zusätzlich ESI-MS) wird lyophilisiert, in 1 ml Wasser aufgenommen, der Niederschlag zentrifugiert und der klare Überstand durch Gelfiltration gereinigt (Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm); Eluens: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss 0.75 ml / min; Detektion: 214, 254 und 280 nm).

Ausbeute: 9.5 mg (88 %) amorpher farbloser Feststoff,

R_f = 0.10 (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1),

[α]_D²⁵ = -18.4° (0.2, H₂O),

C₈₈H₁₄₉N₇O₆₀ (2265.14),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 2263.88; M_{gef} = 1143.86 (M+H+Na)²⁺, 1154.85 (M+2Na)²⁺.

^1H -NMR (500 MHz, D_2O (mit $[\text{D}_6]$ -DMSO als internem Standard)): δ = 4.93 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.85 (d, $J_{1,2} = 9.6$ Hz, 1H, H-1¹), 4.70 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.69 (d, $J_{1,2} = 3.2$ Hz, 1H, H-1^F), 4.58 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1H, H-1³), 4.54 (d, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, 1H, H-1⁷), 4.52 (d, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, 1H, H-1²), 4.38 (d, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.34 (d, $J_{1,2} = 6.9$ Hz, 1H, H-1⁵), 4.27 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 3H, H-1⁶, H-1^{6'}, H-1^{6''}), 4.20 (m, 1H, H-2³), 3.98 – 3.87 (m, 3H, H-2⁴, H-5^F, H-2⁴), 3.82 – 3.27 (m, 65H, H-6a⁵, H-6a^{5'}, H-6a², H-6a⁴, H-5⁴, H-4⁶, H-4^{6'}, H-4^{6''}, H-6a⁷, H-3⁴, H-6a⁴, H-6a¹, H-3^F, H-3⁴, H-6b⁵, H-6b^{5'}, H-2¹, H-3², H-6b², H-6a³, H-3³, H-4^F, H-6b³, H-2^F, H-6b⁷, H-3¹, H-4¹, H-2², H-6a⁶, H-6a^{6'}, H-6a^{6''}, H-6b⁶, H-6b^{6'}, H-6b^{6''}, H-5¹, H-2⁵, H-2^{5'}, H-3⁵, H-3^{5'}, H-3⁷, H-5⁶, H-5^{6'}, H-5^{6''}, H-2⁷, H-4⁵, H-4^{5'}, H-4⁷, H-6b¹, H-3⁶, H-3^{6'}, H-3^{6''}, H-4³, H-5², H-5³, H-6b⁴, H-4², H-6b⁴, H-5⁵, H-5^{5'}, H-5⁴, H-2⁶, H-2^{6'}, H-2^{6''}, H-4⁴, H-4^{4'}, H-5⁷), 2.71 (t, $J_{\delta,\epsilon} = 7.5$ Hz, 2H, ϵ -CH₂), 2.08 (t, $J_{\alpha,\beta} = 7.1$ Hz, 2H, α -CH₂), 1.90, 1.86, 1.85, 1.84, 1.81 (5s, 15H, NAc), 1.46 – 1.37 (m, 4H, δ -CH₂, β -CH₂), 1.14 (m, 2H, γ -CH₂), 1.01 (d, $J_{5,6} = 6.6$ Hz, 3H, H-6^F).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O (mit $[\text{D}_6]$ DMSO als internem Standard)): δ = 178.80, 176.30 - 175.70 (C=O), 104.28 (C-1⁶, C-1^{6'}, C-1^{6''}), 102.88 (C-1³), 102.39 (C-1²), 102.23 (C-1⁷), 100.99 (C-1⁵), 100.87 (C-1⁵), 100.79 (C-1^F), 100.56 (C-1⁴), 98.44 (C-1⁴), 82.80 (C-4²), 80.00 (C-4¹), 79.97 (C-4⁵, C-4^{5'}, C-4⁷), 79.70 (C-1¹), 78.85 (C-3³), 77.82 (C-2⁴), 77.78 (C-2⁴), 76.67 (C-5⁶, C-5^{6'}, C-5^{6''}), 76.66 (C-5¹), 76.53 (C-2³), 76.18 (C-5⁷), 76.14 (C-5⁵, C-5^{5'}), 75.68 (C-5³), 75.65 (C-5²), 74.78 (C-5⁴), 74.45 (C-5⁴), 74.13 (C-3¹), 73.90 (C-3⁶, C-3^{6'}, C-3^{6''}), 73.35 (C-3⁵, C-3^{5'}), 73.35 (C-3⁷), 73.31 (C-3²), 73.26 (C-4^F), 72.38 (C-2⁶, C-2^{6'}, C-2^{6''}), 70.93 (C-3^F), 70.86 (C-3⁴), 70.86 (C-3⁴), 69.89 (C-4⁶, C-4^{6'}, C-4^{6''}), 69.58 (C-2^F), 68.66 (C-4⁴, C-4^{4'}), 68.21 (C-6¹), 68.16 (C-5^F), 68.12 (C-6³), 68.04 (C-4³), 63.08 (C-6⁴), 62.92 (C-6⁴), 62.32 (C-6⁶, C-6^{6'}, C-6^{6''}), 61.34 (C-6⁵, C-6^{5'}, C-6⁷), 60.95 (C-6²), 56.41 (C-2², C-2⁵, C-2^{5'}, C-2⁷), 55.15 (C-2¹), 40.86 (C-6 AH), 36.88 (C-2 AH), 28.80 (C-5 AH), 26.44 (C-4 AH), 25.99 (C-3 AH), 23.90 - 23.70 (NAc), 16.79 (C-6^F).

*N*¹-(6-Aminohexanoylamido)-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2→3)-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2→3)-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3))]-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2→3)-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6))]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(α-L-fucopyranosyl)-(1→6)]-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid **64**

0.1 mg (44.15 nmol) Dodecasaccharid **63** werden in 57 µl 50 mM Natriumkacodylatpuffer pH 6.5 gelöst. Der Puffer enthält 50 µg Rinderserumalbumin, 0.5 µmol NaN₃, 0.39 mg (0.51 µmol) Cytidin-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminsäure, 200 mU alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) und 2.5 mU α-(2,3)-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.6). Die Reaktionsmischung wird bei 37°C inkubiert. Bei einer nach 2 Stunden entnommenen Massenprobe zeigt sich neben wenig unsialyliertem Edukt, einfacher und doppelter Sialylierung auch schon ein geringer Anteil des dreifach sialylierten Produkts. Nach 48 Stunden bildet die persialylierte Verbindung laut Massenspektrometrie das Hauptprodukt.

C₁₂₁H₂₀₀N₁₀O₈₄ (3138.90),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 3137.17$; $M_{\text{gef}} = 1289.68$ (1 x Sial.+H+Na)²⁺, 1435.27 (2 x Sial.+H+Na)²⁺, 1580.79 (3 x Sial.+H+Na)²⁺.

8.9 Versuche zu Kapitel 4

Neoglycokonjugat 66

In einem 1.5 ml Eppendorf-Gefäß werden 0.77 mg (0.34 μ mol) 6-Aminohexanoyl-*N*-Glycan **63** in 200 μ l Natriumhydrogencarbonatlösung (100 mg / 10 ml) aufgenommen und mit 200 μ l Dichlormethan sowie 1.5 μ l (19.7 μ mol) Thiophosgen versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur heftig gerührt, so dass eine gute Durchmischung der beiden Phasen gewährleistet ist. Nach 4 Stunden (DC: i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1) wird zentrifugiert und die wässrige Phase abgetrennt. Die organische Phase wird noch zweimal mit je 100 μ l Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zweimal mit je 500 μ l Dichlormethan gewaschen. Zu der wässrigen Lösung des Isothiocyanats **65** gibt man 2.0 mg kohlenhydratfreies Rinderserumalbumin und läßt 6 Tage bei Raumtemperatur reagieren.

Die Reaktionslösung wird zentrifugiert und der klare Überstand durch Gelfiltration gereinigt (Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm); Eluens: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss 0.75 ml / min; Detektion: 214 und 254 nm).

Ausbeute: 2.07 mg amorpher farbloser Feststoff,

R_f Edukt **63** = 0.14 (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1),

R_f Isothiocyanat **65** = 0.50 (i-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1).

MALDI-MS: M_{ber} = 68694, 70957, 73220, 75484 (1, 2, 3, bzw. 4 Zuckereinheiten pro BSA);

M_{gef} = 68649, 70971, 73242, 75475 (1, 2, 3, bzw. 4 Zuckereinheiten pro BSA)

8.10 Versuche zu Kapitel 5.1

2-Acylamino-2-desoxy-1,3,4,6-tetraacetyl-D-glucopyranose

Die folgende Synthese ist exemplarisch mit Palmitinsäure (C-16) beschrieben, wurde aber auch mit Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Myristin- und Behensäure durchgeführt (C-6, 8, 10, 12, 14, 22):

Zu einer Lösung von 4.88 g (19.03 mmol) Palmitinsäure in 150 ml Ethanol und 5.30 ml (38. mmol) Triethylamin wird eine Lösung von 3.75 g (17.30 mmol) D-Glucosaminhydrochlorid **67** in 75 ml Wasser gegeben. Die Reaktionslösung wird mit 4.00 g (20.80 mmol) EDC und 2.57 g (19.03 mmol) HOBt versetzt und bei Raumtemperatur für 48 Stunden gerührt. Es wird am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit 30 ml Acetonitril codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird unter Eiskühlung in einem Gemisch aus 200 ml Pyridin und 100 ml Essigsäureanhydrid gelöst, bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt, am Rotationsverdampfer eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 40 mm, Füllhöhe: 10 cm, Cyclohexan / Essigsäureethylester, 1.8:1).

Ausbeute: 7.43 g (80.2 %) amorpher Feststoff,

$R_f = 0.39$ (*n*-Hexan / Essigsäureethylester, 1.5:1),

$C_{30}H_{51}NO_{10}$ (585.73),

EI-MS: $M_{ber} = 585.35$; $M_{gef} = 585$.

Diese Produkt entstehen als α : β Gemisch; bei kürzerkettigen Fettsäuren (z.B. Capronsäure) beträgt der β -Anteil ca. 50 %, bei Palmitinsäure ca. 20 %.

Angegeben ist im Folgenden 2-Palmitoylamido-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α , β -D-glucopyranose (die anderen Acylverbindungen unterschieden sich nur unwesentlich bezüglich NMR-Verschiebungen):

1H -NMR der α -Verbindung (270 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 7.98$ (d, $J_{NH,2} = 8.79$ Hz, 1H, NH^α), 5.90 (d, $J_{2,1} = 3.23$ Hz, 1H, $H-1^\alpha$), 5.18 (dd, 1H, $H-3^\alpha$), 4.98 (dd, 1H, $H-4^\alpha$), 4.31 – 3.94 (m, 4H, $H-2^\alpha$, $H-6a^\alpha$, $H-5^\alpha$, $H-6b^\alpha$), 2.16 – 1.88 (m, 14H, $C(O)CH_2$, 4 OAc), 1.42 (m, 2H, $C(O)CH_2CH_2$), 1.19 (m, 24H, $(CH_2)_{12}$), 0.85 (t, 3H, CH_3).

^1H -NMR der β -Verbindung (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.92$ (d, $J_{\text{NH},2} = 9.00$ Hz, 1H, NH^β), 5.71 (d, $J_{2,1} = 8.78$ Hz, 1H, H-1^β), 5.18 (dd, 1H, H-3^β), 4.88 (dd, 1H, H-4^β), 4.31 – 3.94 (m, 4H, H-6a^β , H-6b^β , H-5^β , H-2^β), 2.16 – 1.88 (m, 14H, C(O)CH_2 , 4 OAc), 1.42 (m, 2H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2$), 1.19 (m, 24H, $(\text{CH}_2)_{12}$), 0.85 (t, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (67.94 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 173.18$ (C(O)NHR^α , C(O)NHR^β), 170.82 – 169.56 (OAc), 92.52 (C-1^β), 90.41 (C-1^α), 72.92 (C-3^β), 72.26 (C-5^β), 70.64 (C-3^α), 69.85 (C-5^α), 68.88 (C-4^β), 68.87 (C-4^α), 62.24 (C-6^α), 62.13 (C-6^β), 52.48 (C-2^β), 50.46 (C-2^α), 36.20 (C(O)CH_2), 31.26, 25.66, 22.56 (alkyl-C), 21.58 – 21.09 (OAc), 14.55 (CH_3).

2-Acylamido-2-desoxy-D-glucopyranose (68, 69, 70, 71)

A) Ausgehend von 2-Palmitoylamido-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α,β -D-glucopyranose. Die folgende Vorschrift ist exemplarisch für 2-Palmitoylamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose beschrieben, wurde aber auch mit den entsprechenden Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Myristin- und Behensäurederivaten durchgeführt:

6.3 g (10.76 mmol) der peracetylierten, gereinigten 2-Palmitoylamido-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α,β -D-glucopyranose werden in einer Lösung von 0.28 g (12.18 mmol) Natrium in 50 ml absolutem Methanol bei Raumtemperatur gerührt. Nach 90 Minuten wird die Reaktionslösung zentrifugiert und der farblose Feststoff jeweils mit Methanol, Wasser und Dichlormethan gewaschen und zentrifugiert. Es werden 3.20 g (7.66 mmol; 71 %) farbloser Feststoff erhalten, der nur sehr schlecht oder gänzlich unlöslich ist in wässrigen und organischen Lösungsmitteln. Laut NMR liegt ein $\alpha:\beta$ -Verhältnis von ca. 2:1 vor.

Ausbeute: 3.20 g (71 %) farbloser Feststoff,

$\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{NO}_6$ (417.58),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 417.31$; $M_{\text{gef}} = 418.98$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

^1H -NMR der α -Verbindung (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.47$ (d, $J_{\text{NH},2} = 8.15$ Hz, 1H, NH^α), 6.37 (d, $J_{\text{OH},1} = 3.64$ Hz, 1H, OH-1^α), 4.92 – 4.88 (m, 1H, H-1^α), 4.86 (d, $J_{4,\text{OH}} = 5.36$ Hz, 1H, OH-4^α), 4.55- 4.35 (m, 2H, OH-3^α , OH-6^α), 3.70 – 3.05 (m, 6H, H-6a^α , H-5^α , H-2^α , H-3^α , H-6b^α , H-4^α), 2.09 (m, 2H, C(O)CH_2), 1.46 (m, 2H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2$), 1.24 (m, 24H, $(\text{CH}_2)_{12}$), 0.86 (t, 3H, CH_3).

^1H -NMR der β -Verbindung (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 7.63 (d, $J_{\text{NH},2}$ = 7.93 Hz, 1H, NH^β), 6.44 (d, $J_{\text{OH},1}$ = 6.22 Hz, 1H, $\text{OH}-1^\beta$), 4.92 – 4.88 (m, 1H, $\text{OH}-4^\beta$), 4.76 (d, $J_{3,\text{OH}}$ = 4.93 Hz, 1H, $\text{OH}-3^\beta$), 4.55– 4.35 (m, 2H, $\text{OH}-6^\beta$, $\text{H}-1^\beta$), 3.70 – 3.05 (m, 6H, $\text{H}-6\text{a}^\beta$, $\text{H}-6\text{b}^\beta$, $\text{H}-2^\beta$, $\text{H}-3^\beta$, $\text{H}-5^\beta$, $\text{H}-4^\beta$), 2.09 (m, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 1.46 (m, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.24 (m, 24H, $(\text{CH}_2)_{12}$), 0.86 (t, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (67.94 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 173.19 ($\text{C}=\text{O}^\beta$), 173.06 ($\text{C}=\text{O}^\alpha$), 96.35 ($\text{C}-1^\beta$), 91.36 ($\text{C}-1^\alpha$), 77.53 ($\text{C}-5^\beta$), 75.11 ($\text{C}-3^\beta$), 72.81 ($\text{C}-5^\alpha$), 71.92 ($\text{C}-4^\alpha$), 71.63 ($\text{C}-4^\beta$), 71.19 ($\text{C}-3^\alpha$), 61.88 ($\text{C}-6^\alpha$), 61.29 ($\text{C}-6^\beta$), 57.84 ($\text{C}-2^\beta$), 54.95 ($\text{C}-2^\alpha$), 36.02 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 32.05 – 22.86 (alkyl-C), 26.08 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$), 15.02 (CH_3).

B) Ausgehend von D-Glucosaminhydrochlorid und Palmitinsäurechlorid. Die folgende Vorschrift ist exemplarisch für 2-Palmitoylamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose **70** beschrieben, wurde aber auch für die entsprechende Capron- und Caprinsäureverbindung **68** bzw. **69** durchgeführt:

4.0 g (18.56 mmol) D-Glucosaminhydrochlorid **67** werden in einer Lösung von 1 g Natrium in 40 ml absolutem Methanol 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das entstehende Natriumchlorid wird abzentrifugiert und die klare, leicht gelbe Lösung unter Eiskühlung mit 8.44 ml (27.84 mmol) Palmitoylchlorid versetzt. Der sich sofort bildende farblose Niederschlag wird nach 60 Minuten Rühren bei Raumtemperatur abzentrifugiert, jeweils dreimal mit Methanol bzw. Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 2.26 g (5.40 mmol; 29 %) eines farblosen Feststoffs erhalten. Die NMR-Daten entsprechen den nach Weg A) dargestellten Verbindungen.

1-Nonyl-2-acetylamino-2-desoxy- α -D-glucopyranosid 73

Eine Lösung von 13.3 ml (77.0 mmol) 1-Nonanol und 0.35 g (1.80 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in 40 ml Dioxan wird auf 80°C erhitzt und mit 2.48 g (11.21 mmol) *N*-Acetylglucosamin versetzt. Die zunächst farblose Suspension verfärbt sich nach 3 Stunden Rühren bei 80°C rotbraun. Danach wird die Temperatur auf 90°C erhöht, nach weiteren 3 Stunden Rühren auf ca. $\frac{3}{4}$ des Ursprungsvolumens eingeengt und für weitere 16 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 2 N Natriumhydroxidlösung neutralisiert, der farblose Niederschlag (nicht umgesetztes *N*-Acetylglucosamin) durch Zentrifugation

abgetrennt, zweimal mit Dioxan gewaschen und verworfen. Die vereinigten, klaren, bernsteinfarbenen organischen Phasen werden eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der kristalline Rückstand wird in Essigsäureethylester / Ethanol 9:1 gelöst und durch Flashchromatographie gereinigt (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 10 cm, Essigsäureethylester / Ethanol, 9:1).

Ausbeute: 1.26 g (32 %) farblose Kristalle,

$R_f = 0.81$ (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1),

$R_f = 0.18$ (Essigsäureethylester / Ethanol, 9:1),

$C_{17}H_{33}NO_6$ (347.45),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 347.23$; $M_{gef} = 348.24$ (M+H)⁺.

Produkt ist fast ausschließlich α -konfiguriert (β -Anteil < 2 %):

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.65$ (d, $J_{NH,2} = 7.83$ Hz, 1H, NH ^{α}), 4.97 (d, $J_{OH,4} = 5.15$ Hz, 1H, OH-4 ^{α}), 4.67 (d, $J_{OH,3} = 5.47$ Hz, 1H, OH-3 ^{α}), 4.61 (d, $J_{2,1} = 3.22$ Hz, 1H, H-1 ^{α}), 4.47 (dd, 1H, OH-6 ^{α}), 3.65 – 3.56 (m, 2H, H-2 ^{α} , H-6a ^{α}), 3.52 (m, 1H, OCH₂), 3.49 – 3.40 (m, 2H, H-3 ^{α} , H-6b ^{α}), 3.34 (m, 1H, H-5 ^{α}), 3.26 (m, 1H, OCH₂), 3.12 (m, 1H, H-4 ^{α}), 1.81 (s, 3H, NAc), 1.48 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.23 (m, 12H, (CH₂)₆), 0.84 (t, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (67.94 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.35$ (C=O ^{α}), 96.53 (C-1 ^{α}), 72.76 (C-5 ^{α}), 70.84 (C-4 ^{α}), 70.62 (C-3 ^{α}), 66.73 (OCH₂-Alkyl), 60.83 (C-6 ^{α}), 53.91 (C-2 ^{α}), 31.31, 29.06, 28.91, 28.86, 28.70, 25.58 (6 CH₂-Alkyl), 22.54 (NAc), 22.09 (CH₂-Alkyl), 13.94 (CH₃-Alkyl).

1-Hexadecyl-2-acetylamino-2-desoxy- α -D-glucopyranosid 74

Darstellung erfolgt wie oben für 1-Nonyl-2-acetylamino-2-desoxy- α -D-Glucopyranosid **73** beschrieben, jedoch mit 18.7 g (77.0 mmol) 1-Hexadecanol.

Ausbeute: 1.39 g (34 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.81$ (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetat, 4:1),

$R_f = 0.18$ (Essigsäureethylester / Ethanol, 9:1),

$C_{24}H_{47}NO_6$ (445.63),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 445.34$; $M_{gef} = 446.34$ (M+H)⁺.

Produkt ist ausschließlich α -konfiguriert; die Verschiebungen im NMR-Spektrum unterscheiden sich nur unwesentlich von 1-Nonyl-2-acetylamino-2-desoxy- α -D-Glucopyranosid **73**, weshalb nur das ^1H -NMR angegeben ist:

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 7.64 (d, $J_{\text{NH},2}$ = 8.15 Hz, 1H, NH), 4.97 (d, $J_{\text{OH},4}$ = 5.36 Hz, 1H, OH-4), 4.67 (d, $J_{\text{OH},3}$ = 5.57 Hz, 1H, OH-3), 4.62 (d, $J_{2,1}$ = 3.43 Hz, 1H, H-1), 4.46 (dd, 1H, OH-6), 3.64 – 3.57 (m, 2H, H-2, H-6a), 3.53 (m, 1H, OCH₂), 3.50 – 3.40 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.36 (m, 1H, H-5), 3.26 (m, 1H, OCH₂), 3.12 (m, 1H, H-4), 1.81 (s, 3H, NAc), 1.46 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.23 (m, 26H, (CH₂)₁₃), 0.85 (t, 3H, CH₃).

2-Acetylamino-2-desoxy-N-hexadecyl- β -D-glucopyranosylamin 75

Eine Lösung von 5.20 g (21.43 mmol) Hexadecylamin in 50 ml *i*-Propanol wird mit einer Lösung von 5.30 g (23.96 mmol) *N*-Acetylglucosamin in 50 ml Wasser vereinigt und 8 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es bildet sich ein farbloser zäher Niederschlag. Es wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und das bräunliche Produkt im Hochvakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das Rohprodukt nacheinander dreimal mit Wasser, dreimal mit Dichlormethan und einmal mit *i*-Propanol / Wasser (2:1) gewaschen, jeweils zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Produkt wird dreimal mit je 20 ml Acetonitril codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.78 g (19 %) Feststoff,

R_f = 0.88 (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetat, 4:1),

$\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_5$ (444.65),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 444.36; M_{gef} = 446.13 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Produkt ist ein Gemisch der Anomeren α : β in einem Verhältnis von 1:4:

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 7.64 (d, $J_{\text{NH},2}$ = 8.79 Hz, 1H, NH ^{β}), 7.54 (d, $J_{\text{NH},2}$ = 8.25 Hz, 0.26H, NH ^{α}), 4.87 (d, $J_{\text{OH},4}$ = 4.07 Hz, 1H, OH-4 ^{β}), 4.80 (d, $J_{\text{OH},3}$ = 4.40 Hz, 1H, OH-3 ^{β}), 4.35 (dd, 1H, OH-6 ^{β}), 3.72 (d, $J_{2,1}$ = 9.75 Hz, 1H, H-1 ^{β}), 3.65 (m, 1H, H-6a ^{β}), 3.53 – 3.15 (m, 3H, H-6b ^{β} , H-2 ^{β} , H-3 ^{β}), 3.08 – 2.98 (m, 2H, H-4 ^{β} , H-5 ^{β}), 2.73 (m, 1H, N-CH₂), 2.44 (m, 1H, N-CH₂), 1.81 (s, 3H, NAc), 1.27 (m, 28H, (CH₂)₁₄), 0.85 (t, 3H, CH₃).

^{13}C -NMR (67.94 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 169.68 ($\text{C}=\text{O}^\beta$), 169.08 ($\text{C}=\text{O}^\alpha$), 89.86 ($\text{C}-1^\beta$), 77.41 ($\text{C}-4^\beta$), 74.99 ($\text{C}-3^\beta$), 71.11 ($\text{C}-5^\beta$), 61.33 ($\text{C}-6^\beta$), 55.25 ($\text{C}-2^\beta$), 44.96, 31.27, 29.03, 28.68, 26.64 (CH_2 -Alkyl), 22.92 (NAc), 22.07 (CH_2 -Alkyl), 13.92 (CH_3 -Alkyl).

8.11 Material und Methoden zu Kapitel 5.2.1

Für die Wurzelhaartests wurde ein Stickstoff-freies Nährmedium verwendet. Dazu wurden 12 g Agar (Agar No. 1 der Firma Oxoid) mit entmineralisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Die Suspension wurde für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert, in einem 60°C-Schrank abgekühlt, bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt, mit Nährlösung versetzt und in Petrischalen gegossen. Die Nährlösung setzt sich zusammen aus je 0.5 ml der autoklavierten, sterilen Stammlösungen A, B2, C und D und 1.5 ml der Lösung B1.^[72]

Lösung	Verwendete Substanzen	Menge (g/l)
A	CaCl ₂	194
B1	K ₂ HPO ₄	136.0
B2	KH ₂ PO ₄	64.0
C	Fe-Citrat	6.7
	MgSO ₄ *7H ₂ O	123.3
	K ₂ SO ₄	87.0
	MnSO ₄ *H ₂ O	0.338
D	H ₃ BO ₄	0.247
	ZnSO ₄ *H ₂ O	0.288
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0.100
	CoSO ₄ *7H ₂ O	0.056
	Na ₂ MoO ₂ *2H ₂ O	0.048

Tab. 8.1: Verschiedene, für das stickstoff-freie Nährmedium benötigte Lösungen; die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf 1 l Wasser.^[72]

Zur Vorbereitung der Wurzelhaartests wurden die später verwendeten Samen von *Medicago sativa cultivar Europe* (Luzerne) mit 32 %-iger Salzsäure bedeckt, bei Raumtemperatur 15 Minuten gerührt, die Salzsäure dekantiert und die Samen mehrmals mit insgesamt ca. 1 l entmineralisiertem, autoklaviertem Wasser gewaschen. Bei jedem Waschvorgang wurde der pH kontrolliert, da Reste von Salzsäure in der Samenschale später den pH des verwendeten Nährmediums verändern und zu einer Testverfälschung führen können. Die sterilen Samen wurden auf dem sterilen Nährmedium aufgebracht und die Platten für 2 Tage senkrecht (damit die Pflanzenwurzeln auf der Oberfläche des Mediums und nicht in das Medium wachsen) bei

20°C in Dunkelheit aufbewahrt. Danach wurden die Samen vereinzelt, je 6 Samen in eine Petrischale mit Nährmedium gegeben und für weitere 24 Stunden aufbewahrt. Anschließend wurden die zu testenden Substanzen als 10^{-4} molare Lösungen auf die Mitte der Wurzeln getropft und der Inokulationsbereich auf der Rückseite der Petrischale für die spätere mikroskopische Untersuchung markiert.

Zur Herstellung der Testlösungen wurden die in reinem Wasser nur sehr schlecht oder unlöslichen Verbindungen zunächst in der minimal notwendigen Menge Dimethylsulfoxid gelöst, und diese Stammlösung mit Wasser auf 10^{-4} mol/l verdünnt. Das Capronsäurederivat **68** konnte in reinem Wasser gelöst werden.

Für jede zu testende Verbindung wurden drei Petrischalen mit je 6 Samen inokuliert.

8.12 Material und Methoden zu Kapitel 5.2.2

Die Arbeiten zur Untersuchung der Auswirkung von acylierten monomeren Glucosaminen auf das Saatgut von Weizen und Mais wurden von Dr. *G. Kretzschmar* (Frankfurt) vorgenommen.^[142] Das zu untersuchende Saatgut wird dafür mit einer Formulierung, die aus Wasser (0.0 % - 41.7 %), einer Farbstofflösung (1.4 % - 4.0 %), einer nicht näher bezeichneten Proteinformulierung (55.1 % - 91.0 %), der zu untersuchenden Substanz (1.8 % - 5.0 %; bzw. bei Blindproben 0.0 % (keine Substanz)) und in einem Fall (s. Tabelle) Fluquinconazol (34 %) besteht, überzogen („coating“) und 20 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die einzelnen Samen werden in einem festen Abstand voneinander ausgesät und mit einer Mischung aus der verwendeten Erde und Quarzsand überschichtet. Beobachtet wurden hierbei über einen Zeitraum von 14 Tagen u.a. die Anzahl der gekeimten Körner (Keimfähigkeit), die Länge und das Gewicht der Pflanzen. Die von Dr. *G. Kretzschmar* übermittelten Werte verstehen sich relativ zu den Blindproben in Prozent.

8.13 Versuche zu Kapitel 5.3.1

3,6-Di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid 78

10.16 g (19.8 mmol) Glucopyranosid **77** werden in 100 ml absolutem Dichlormethan gelöst, unter ständigem Rühren mit 3.0 g Molekularsieb versetzt und in einem Eisbad gekühlt. Unter Schutzgas (Argon) werden 17.06 ml (107.0 mmol) auf 0°C vorgekühltes Triethylsilan zugegeben und anschließend 8.0 ml (78,7 mmol) Trifluoressigsäure innerhalb von 30 Minuten langsam (!) zugetropft. Die Kühlung wird entfernt und das Gemisch wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung (DC: Cyclohexan / Essigsäureethylester, 2:1) wird über Celite filtriert und mit Kaliumhydroxid-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (12,7 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 70 mm, Füllhöhe: 12 cm, Cyclohexan / Essigsäureethylester, 4:1 => 1:1).

Ausbeute: 9.32 g (91 %) farbloses Öl,

$R_f = 0.58$ (Cyclohexan / Essigsäureethylester, 2:1),

$C_{28}H_{26}N_4O_6$ (514.53).

1H -NMR (270 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 7.89 - 7.84$ (m, 4H, Pht), $7.38 - 7.36$ (m, 5H, Ar), $6.91 - 6.88$ (m, 5H, Ar), 5.77 (d, $J_{H-4,OH} = 7.08$ Hz, 1H, OH-4), 5.43 (d, $J_{1,2} = 9.43$ Hz, 1H, H-1), 4.78 (d, $J_{gem} = 12.22$ Hz, 1H, CH₂O), $4.59 - 4.54$ (s, 2H, CH₂O), 4.42 (d, $J_{gem} = 12.22$ Hz, 1H, CH₂O), $4.16 - 3.99$ (m, 1H, H-3), $3.86 - 3.78$ (m, 2H, H-2, H-6a), $3.74 - 3.65$ (m, 2H, H-5, H-6b), $3.58 - 3.49$ (m, 1H, H-4).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 139.04$, 138.72 (C-i Ph), 135.36 (C-4/5 Pht), 131.22 (C-1/2 Pht), 128.77 , 128.35 , 127.98 , 127.92 , 127.70 (C-Ar), 123.96 (C-3/6 Pht), 85.56 (C-1), 78.92 (C-3), 78.46 (C-5), 74.20 (CH₂O), 72.90 (CH₂O), 71.75 (C-4), 69.52 (C-6), 55.25 (C-2).

O-(3,6-Di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **30**

12.21 g (20.01 mmol) Thioglucosid **76** und 7.32 g (14.22 mmol) Azid **78** werden in 250 ml absolutem Dichlormethan gelöst, nach Zugabe von 2.3 g gepulvertem, frisch geglühtem Molekularsieb 4Å unter Eiskühlung 20 min gerührt und mit 9.40 g (41.82 mmol) *N*-Iodsuccinimid versetzt. Danach werden portionsweise 0.78 ml (8.89 mmol) Trifluormethansulfonsäure zugegeben. Nach 15 Minuten zeigt sich (DC: Hexan / Aceton, 2:1) vollständiger Umsatz. Das Reaktionsgemisch wird je einmal mit ges. Natriumthiosulfatlösung (bis zur Entfärbung) und danach mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Danach wird die organische Phase abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt.

Der erhaltene amorphe Feststoff wird in 250 ml Dichlormethan und 125 ml Methanol gelöst, mit 4.0 g feingepulvertem Kaliumcarbonat versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Dünnschichtchromatographie (Dichlormethan / Methanol, 100:1) zeigt vollständigen Umsatz. Es wird filtriert und das Filtrat mit 0.3 ml Eisessig auf pH 6 eingestellt. Anschließend wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (18.8 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 90 mm, Füllhöhe: 10 cm, Cyclohexan / Aceton, 3.5:1).

Ausbeute: 12.90 g (92 %) amorpher Feststoff,

R_f = 0.44 (Hexan / Aceton, 2:1),

R_f = 0.10 (Dichlormethan / Methanol, 100:1),

$[\alpha]_D^{24}$ = -8.4° (0.8, Dichlormethan),

$C_{56}H_{51}N_5O_{12}$ (986.03),

FAB-MS[NBA neg.]: M_{ber} = 985.35; M_{gef} = 956 [M-H-N₂]⁻, 984 [M-H]⁻.

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7.99 - 6.70 (m, 28H, Ar), 5.66 (d, $J_{OH,4}$ = 6.89 Hz, 1H, OH-4²), 5.30 (d, $J_{1,2}$ = 9.37 Hz, 1H, H-1¹ β), 5.26 (d, $J_{1,2}$ = 8.04 Hz, 1H, H-1² β), 4.84 – 4.75 (m, 2H, CH₂O), 4.60 (d, J_{gem} = 12.39 Hz, 1H, CH₂O), 4.50-4.36 (m, 5H, CH₂O), 4.20-3.90 (m, 4H, H-3², H-3¹, H-4¹, H-2²), 3.85-3.76 (m, 2H, H-6a², H-2¹), 3.60-3.38 (m, 6H, H-5¹, H-6b², H-6a¹, H-5², H-4², H-6b¹).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 168.06, 167.70 (C=O), 139.34, 138.85, 138.64, 138.58 (C-i), 135.38 (C-4/5 Pht), 131.40, 131.18 (C-1/2 Pht), 128.81, 128.70, 128.36, 128.13, 127.92, 127.86, 127.65, 127.56 (C-Ar), 124.03 (C-3/6 Pht), 97.04 (C-1²), 85.42 (C-1¹), 78.95 (C-3²), 76.75 (C-3¹), 76.67 (C-5²), 76.30 (C-5¹), 75.35 (C-4¹), 74.16, 72.94 (CH₂O), 72.27 (C-4²), 69.48 (C-6²), 68.00 (C-6¹), 56.53 (C-2²), 55.20 (C-2¹).

O-(3,6-Di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **79**

16.4 g (26.88 mmol) Thioglycosid **76**, 12.7 g (12.88 mmol) Chitobiosylazid **30** und 2.5 g gepulvertes, frisch geglühtes Molekularsieb 4Å werden unter Argon und Eiskühlung in 250 ml absolutem Dichlormethan gelöst und 20 Minuten gerührt. Anschließend werden 9.1 g (40.45 mmol) *N*-Iodsuccinimid und portionsweise 0.71 ml (8.01 mmol) Trifluormethansulfonsäure zugegeben. Die Dünnschichtchromatographie (Hexan / Aceton, 2:1) zeigt nach 20 Minuten vollständigen Umsatz. Es wird je einmal mit ges. Natriumthiosulfatlösung (bis zur vollständigen Entfärbung) und danach mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt.

Zur Entschützung wird das Rohprodukt (28.50 g) in 500 ml Dichlormethan und 250 ml Methanol gelöst und mit 13.50 g fein gepulvertem Kaliumcarbonat versetzt. Das Gemisch wird 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (DC: Dichlormethan / Methanol, 80:1), filtriert und anschließend durch tropfenweise Zugabe von Eisessig auf einen pH von 6 gebracht. Es wird eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (28.73 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 90 mm, Füllhöhe: 14 cm, Cyclohexan / Aceton, 3.5:1).

Ausbeute: 16.8 g (90 %) amorph,

R_f = 0.16 (Hexan / Aceton, 2:1),

R_f = 0.22 (Dichlormethan / Methanol, 80:1),

$[\alpha]_D^{25}$ = -11.0° (0.5, Dichlormethan),

$\text{C}_{84}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{O}_{18}$ (1457.53),

FAB-MS: M_{ber} = 1456.52; M_{gef} = 1428 $[\text{M}-\text{N}_2]^+$, 1456 $[\text{M}]^+$.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.00-6.60 (m, 42H, Ar), 5.64 (d, $J_{\text{OH},4} = 7.07$ Hz, 1H, OH-4³), 5.26 (d, $J_{1,2} = 9.54$ Hz, 1H, H-1¹), 5.23 (d, $J_{1,2} = 8.35$ Hz, 1H, H-1³), 5.08 (d, $J_{1,2} = 8.15$ Hz, 1H, H-1²), 4.89-4.27 (m, 12H, CH₂O), 4.19-3.25 (m, 16H, H-3³, H-4², H-3², H-3¹, H-4¹, H-2², H-2³, H-6a³, H-2, H-5, H-6b³, H-4³, H-6a¹, H-5³, H-6a², H-6b¹), 3.14 (m, 1H, H-6b²), 2.83 (m, 1H, H-5²).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 168.02, 167.40, 167.01 (C=O), 138.65, 138.24, 138.16, 138.11, 137.93, 137.69 (C-i Ar), 134.85, 134.73 (C-4/5 Pht), 130.78, 130.68, 130.53 (C-1/2 Pht), 128.12, 127.95, 127.72, 127.58, 127.49, 127.24, 127.00, 126.60 (C-Ar), 123.48, 123.38 (C-3/6 Pht), 96.26 (C-1³), 95.82 (C-1²), 84.65 (C-1¹), 78.22 (C-3³), 76.14 (C-3²), 75.84 (C-5³), 75.82 (C-3¹), 75.38 (C-5¹), 74.76 (C-4²), 74.21 (C-4¹), 73.75 (C-5²), 73.40–72.12 (CH₂O), 71.46 (C-4³), 71.40-71.28 (CH₂O), 68.69 (C-6³), 67.40 (C-6¹), 66.61 (C-6²), 55.70 (C-2³), 55.64 (C-2²), 54.32 (C-2¹).

O-(2-Acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosylazid **81**

15.0 g (10.29 mmol) Trisaccharid **79** werden in 600 ml Methanol gelöst, mit 120 ml Ethylendiamin versetzt und bei 60°C für 17 Stunden gerührt. Aufgrund nicht vollständiger Umsetzung (DC: Dichlormethan / Methanol, 100:1) werden weitere 20 ml Ethylendiamin zugegeben und weitere 7 Stunden gerührt. Es wird eingeengt, dreimal mit je 30 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Die so erhaltene Aminoverbindung **80** (Schaum) wird in einem Gemisch aus 100 ml Pyridin und 50 ml Essigsäureanhydrid gelöst, bei Raumtemperatur für 10 Stunden gerührt (DC: *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 30:1), eingeengt und dreimal mit je 20 ml Toluol codestilliert.

Der Rückstand wird in 200 ml Methylamin (41 % Lösung in H₂O) und 100 ml Methanol gelöst und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1). Es wird eingeengt, dreimal mit je 20 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (braunes, öliges Harz) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 90 mm, Füllhöhe: 8 cm, Cyclohexan / Essigsäureethylester, 1:4 => 1:3).

Ausbeute: 11.08 g (90 %) amorpher Feststoff,

$R_f = 0.69$ (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

$[\alpha]_D^{25} = -56.3^\circ$ (1.0, Dichlormethan),

$C_{66}H_{76}N_6O_{15}$ (1193.34),

FAB-MS [NBA neg.]: $M_{ber} = 1192.54$; $M_{gef} = 1191$ $[M-H]^-$.

1H -NMR (500 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 8.05 - 7.88$ (m, 3H, NHAc), 7.38 - 7.02 (m, 30H, Ar), 5.38 (d, $J_{OH,4} = 6.59$ Hz, 1H, OH-4³), 4.95 - 4.24 (m, 15H, CH₂O, H-1², H-1¹, H-1³), 3.91 - 3.10 (m, 18H, H-4¹, H-4², H-6a¹, H-6b¹, H-6a³, H-2¹, H-6a², H-2², H-3², H-5¹, H-3¹, H-2³, H-6b², H-3³, H-6b³, H-4³, H-5³, H-5²), 1.85-1.75 (m, 9H, NHAc).

^{13}C -NMR (125 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 169.26, 169.14$ (C=O), 139.33, 139.16, 139.04, 138.65, 138.60, 138.50, 138.40 (C-i Ar), 128.15, 128.07, 128.00, 127.95, 127.79, 127.74, 127.32, 127.24, 127.11, 126.98, 126.77 (C-Ar), 99.60 (C-1³), 99.57 (C-1²), 87.70 (C-1¹), 82.04 (C-3³), 80.25 (C-3²), 80.13 (C-3¹), 76.06 (C-5¹), 75.66 (C-5³), 74.88 (C-4²), 74.42 (C-4¹), 74.33 (C-5²), 73.15 - 71.63 (CH₂O), 70.14 (C-4³), 69.22 (C-6³), 67.98 (C-6²), 67.91 (C-6¹), 54.81 (C-2²), 54.77 (C-2³), 53.26 (C-2¹), 22.96, 22.88, 22.73 (NHAc).

O-(3,6-Di-*O*-benzyl-4-chloracetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **83**

10.73 g (8.99 mmol) Trisaccharid **81**, 10.24 g (18.03 mmol) Fluorid **82** und 10.23 g Molekularsieb 4Å werden in 330 ml absolutem Dichlormethan 30 Minuten gerührt. Anschließend werden portionsweise 3.80 ml Bortrifluoridetherat zugegeben. Da nach 60 Minuten die Umsetzung noch nicht vollständig ist (DC: Dichlormethan / Methanol, 20:1), werden weitere 0.4 ml Bortrifluoridetherat zugesetzt. Nach 15 Minuten wird über Celite abfiltriert, mit ges. Kaliumhydrogencarbonatlösung und ges. Natriumchloridlösung gewaschen, die organische Phase eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (20.22 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 90 mm, Füllhöhe: 8 cm, Cyclohexan / Essigsäureethylester, 1:7).

Ausbeute: 10.60 g (68 %) amorpher Feststoff,

$R_f = 0.32$ (Dichlormethan / Methanol, 20:1),

$[\alpha]_D^{23} = -26.1^\circ$ (0.8, Dichlormethan),

$C_{96}H_{102}ClN_7O_{22}$ (1741.32),

FAB-MS[NBA neg.]: $M_{ber} = 1739.68$; $M_{gef} = 1739$ $[M-H]^-$.

1H -NMR (500 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 8.05 - 7.75$ (m, 7H, NHAc, NPh), 7.45 - 6.75 (m, 40H, Ar), 5.19 (d, $J_{1,2} = 8.21$ Hz, 1H, H-1⁴), 5.04 (m, 1H, H-4⁴), 4.95 - 4.10 (m, 20H, CH₂O, H-1², H-1¹, H-1³, H-3⁴), 4.05-2.64 (m, 24 H, H-2⁴, H-4³, H-4¹, H-4², H-6a¹, H-2¹, H-6b¹, H-6a², H-3², H-2², H-5¹, H-3¹, H-2³, H-3³, CH₂Cl, H-6a⁴, H-6b², H-5⁴, H-6b⁴, H-6a³, H-5², H-6b³, H-5³), 1.78-1.74 (m, 9H, NHAc).

^{13}C -NMR (125 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 169.25, 169.08, 169.07, 166.44$ (C=O), 139.08, 139.01, 138.49, 138.38, 138.20, 138.04, 137.93, 137.28 (C-i Ar), 134.94 (C-4/5 Ph), 130.54 (C-1/2 Ph), 128.56, 128.28, 128.11, 127.86, 127.72, 127.67, 127.57, 127.47, 127.36, 127.23, 127.18, 127.03, 126.84, 126.69, 126.57, 125.82 (C-Ar), 123.56 (C-3/6 Ph), 99.71 (C-1²), 99.35 (C-1³), 96.05 (C-1⁴), 87.74 (C-1¹), 80.23 (C-3²), 80.11 (C-3¹), 79.78 (C-3³), 75.98 (C-5¹), 75.88 (C-3⁴), 74.56 (C-4¹), 74.55 (C-4²), 74.10 (C-5²), 73.98 (C-4³), 73.37 (C-5³), 73.30, 73.19 (CH₂O), 73.03 (C-4⁴), 72.92 - 72.26 (CH₂O), 72.18 (C-5⁴), 71.61 - 71.26 (CH₂O), 68.00 (C-6⁴), 67.96 (C-6²), 67.91 (C-6¹), 67.38 (C-6³), 55.45 (C-2⁴), 54.85 (C-2³), 54.77 (C-2²), 53.29 (C-2¹), 22.92, 22.84, 22.63 (NHAc).

O-(2-Amino-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **84**

419 mg (0.24 mmol) Tetramer **83** werden in 11 ml absolutem Methanol unter Argon gelöst, mit 1.5 ml Ethylendiamin versetzt und bei 50°C gerührt. Nach 22 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Zur Reinigung wird der Rückstand (580 mg gelbes Öl) in 10 ml Methanol gelöst und im Ultraschallbad langsam mit 10 ml Wasser versetzt; die entstandene Suspension wird kurz zentrifugiert und die überstehende Suspension mit einer Kunststoffspritze durch eine RP18-SepPak-Kartusche gedrückt. Dies wird solange wiederholt, bis die ganze Substanz

aufgegeben ist. Die Trennung erfolgt durch einen Methanol / Wasser-Gradienten: man eluiert sechsmal mit 20 ml Methanol / Wasser 50:50, viermal mit 20 ml 90 % Methanol in Wasser und zweimal mit 20 ml reinem Methanol. Das Produkt eluiert bei 90 % Methanol in Wasser, diese Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 295 mg (80 %) farbloser amorpher Feststoff,

$R_f = 0.69$ (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

$[\alpha]_D^{23} = -45.7^\circ$ (0.2, Dichlormethan),

$C_{86}H_{99}N_7O_{19}$ (1534.74),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1533.70$; $M_{gef} = 1534.95$ (M+H)⁺, 1556.99 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.06 - 7.88$ (m, 3H, NHAc), 7.43 – 7.05 (m, 40H, Ar), 5.27 (d, $J_{OH,4} = 6.52$ Hz, 1H, OH-4⁴), 4.96 - 4.85 (m, 4H, CH₂O), 4.69 – 4.21 (m, 16H, CH₂O, H-1², H-1¹, H-1³, H-1⁴), 3.95-3.04 (m, 23H, H-4³, H-4², H-4¹, H-6a¹, H-6a⁴, H-6a², H-6a³, H-2¹, H-6b¹, H-2², H-3², H-2³, H-5¹, H-3³, H-3¹, H-6b², H-6b³, H-6b⁴, H-4⁴, H-5⁴, H-5², H-5³, H-3⁴), 2.54 (m, 1H, H-2⁴), 1.82-1.74 (m, 9H, NHAc), 1.44 (s, NH₂).

¹³C-NMR(90.56 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.26, 169.12, 169.05$ (NHAc), 139.42, 139.29, 139.16, 139.07, 138.70, 138.62, 138.40, 138.34 (C-i Ar), 128.14, 128.07, 127.98, 127.75, 127.66, 127.39, 127.22, 127.20, 127.10, 127.06, 126.79 (C-Ar), 102.29 (C-1⁴), 99.67 (C-1³), 99.55 (C-1²), 87.72 (C-1¹), 84.45 (C-3⁴), 80.16 (C-3²), 80.10 (C-3¹), 80.02 (C-3³), 76.01 (C-5¹), 75.84 (C-5⁴), 75.02 (C-4²), 74.95 (C-4³), 74.41 (C-4¹), 74.18 (C-5³), 74.12 (C-5²), 73.25 – 71.50 (CH₂O), 69.95 (C-4⁴), 69.24 (C-6⁴), 67.84 (C-6²), 67.84 (C-6³), 67.83 (C-6¹), 56.70 (C-2⁴), 54.72 (C-2²), 54.72 (C-2³), 53.27 (C-2¹), 22.92, 22.85, 22.74 (NHAc).

(R,S)-3-Hydroxyhexadecansäurebenzylester **87**

5.83 g (0.09 mol) Zink-Späne werden in 2.5 ml trockenem Ether (filtriert durch Alox B) und 10 ml Benzol auf 80°C erwärmt. Anschließend werden 10.0 g (0.05 mol) Tetradecanal **86** und 9.0 ml (0.06 mol) Bromessigsäurebenzylester **85** in 2.5 ml trockenem Ether und 10 ml Benzol gelöst und langsam zur Reaktion gegeben. Nach 40 Minuten (DC: Cyclohexan / Essigsäureethylester, 4:1) lässt man auf Raumtemperatur kommen, verdünnt mit Ether und wäscht mit 10 N Schwefelsäure. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit Dichlormethan

gewaschen, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum bis zur Trockne belassen. Die Reinigung des Rohprodukts (18.5 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 65 mm, Füllhöhe: 11 cm, Cyclohexan / Essigsäureethylester, 6:1).

Ausbeute: 9.63 g (56 %) Feststoff,

$R_f = 0.55$ (Cyclohexan / Essigsäureethylester, 4:1),

$C_{23}H_{38}O_3$ (362.55),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 362.28$; $M_{gef} = 385.23$ ($M+Na$)⁺.

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.31$ (s, 5H, Ar), 5.14 (s, 2H, OCH₂), 4.02 (m, 1H, H-3), 2.58 - 2.46 (2 dd, $J_{gem} = 16.50$ Hz, $J_{2a,3} = 3.43$ Hz, $J_{2b,3} = 8.58$ Hz, 2H, H-2a, H-2b), 1.24 (m, 20H, CH₂), 0.87 (t, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (67.97 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.93$ (C=O), 135.68 (Ar-C_i), 128.68, 128.44, 128.32 (CH-Ar), 68.10 (C-3), 66.54 (O-CH₂-Ph), 41.42 (C-2), 36.60 (C-4), 31.98 - 22.75 (Alkyl-CH₂), 14.18 (CH₃).

(R,S)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecansäurebenzylester **88**

9.51 g (26.2 mmol) (*R,S*)-3-Hydroxyhexadecansäurebenzylester **87** werden in 65 ml (0.81 mol) Pyridin bei 60°C unter Rühren gelöst. Anschließend werden 50 mg DMAP zugeben. Nach Zugabe von 12.0 ml (38.7 mmol) Palmitinsäurechlorid wird bei 60°C gerührt. Nach 48 Stunden (DC: Cyclohexan / Essigsäureethylester, 6:1) wird die Lösung langsam und unter Rühren in 500 ml 2 M Schwefelsäure gegossen, mit Dichlormethan extrahiert und die wäßrige Phase noch einmal mit Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit 2 M Schwefelsäure und einmal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum bis zur Trockne belassen. Die Reinigung des Rohprodukts (24.9 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 90 mm, Füllhöhe: 11 cm, Cyclohexan / Essigsäureethylester, 25:1).

Ausbeute: 11.0 g (70 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.68$ (Cyclohexan / Essigsäureethylester, 6:1),

$C_{39}H_{68}O_4$ (600.95),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 600.51$; $M_{\text{gef}} = 623.57$ ($M+Na$)⁺.

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.33$ (s, 5H, Ar), 5.22 (m, 1H, H-3), 5.09 (s, 2H, OCH₂), 2.66 - 2.51 (m, 2H, H-2a, H-2b), 2.21 - 2.16 (m, 2H, H-2a', H-2b'), 1.64 - 1.47 (m, 4H, H-3', H-4), 1.24 (m, 46H, CH₂), 0.87 (t, 6H, CH₃).

¹³C-NMR(67.97 MHz, CDCl₃): $\delta = 173.19$, 170.35 (C=O), 128.59, 128.38, 128.32 (CH-Ar), 70.33 (C-3), 66.50 (O-CH₂-Ph), 39.39 (C-2), 34.50, 34.11 (C-3, C-2'), 31.98 - 22.75 (Alkyl-CH₂), 14.17 (CH₃).

(R,S)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecansäure **89**

9.70 g (16.1 mmol) (*R,S*)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecansäurebenzylester **88** werden in 140 ml Methanol und 55 ml Cyclohexan gelöst, mit 2.50 g Palladium auf Kohle (10 %) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach 60 Minuten (DC: Cyclohexan / Essigsäureethylester, 4:1) wird über Celite filtriert, dreimal mit Cyclohexan und zweimal mit Methanol nachgespült, eingeengt und im Hochvakuum bis zur Trockne belassen.

Ausbeute: 8.11 g (98 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.28$ (Cyclohexan / Essigsäureethylester, 4:1),

$[\alpha]_D^{23} = 0.0^\circ$ (0.6, Dichlormethan),

$C_{32}H_{62}O_4$ (510.83),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 510.46$; $M_{\text{gef}} = 510.21$ (M)⁺, 533.51 ($M+Na$)⁺.

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): $\delta = 9.80 - 8.80$ (s, 1H, COOH), 5.19 (m, 1H, H-3), 2.66 - 2.50 (m, 2H, H-2a, H-2b), 2.28 - 2.23 (m, 2H, H-2a', H-2b'), 1.58 (m, 4H, H-3', H-4), 1.23 (m, 46H, CH₂), 0.86 (t, 6H, CH₃).

¹³C-NMR(67.97 MHz, CDCl₃): $\delta = 176.48$, 173.36 (C=O), 70.06 (C-3), 39.01 (C-2), 34.53, 34.04 (C-3, C-2'), 31.98 - 22.75 (Alkyl-CH₂), 14.17 (CH₃).

O-(3,6-Di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-palmitoylamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid **90**

546 mg (355 μ mol) Amin **84** werden in 18 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit 0.50 ml Triethylamin und 0.12 ml Palmitinsäurechlorid versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 1.5 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) werden weitere 0.5 ml NEt₃ und 0.12 ml Palmitinsäurechlorid zugegeben. Nach 5 Stunden wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (906 mg) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 14 cm, Dichlormethan / Methanol, 70:1 \Rightarrow 50:1).

Ausbeute: 610 mg (96 %) amorph,

R_f = 0.81 (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

[α]_D²⁵ = -40.9° (0.7, Dichlormethan),

C₁₀₂H₁₂₉N₇O₂₀ (1773.15),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 1771.93; M_{gef} = 909.39 (M+2Na)²⁺, 1794.76 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.01 - 7.85 (m, 4H, NH), 7.35 - 7.05 (m, 40H, Ar), 5.36 (d, $J_{1,2}$ = 6.80 Hz, 1H, H-1⁴), 4.95 - 4.70 (m, 4H, CH₂O), 4.61 - 4.25 (m, 15H, H-1², H-1³, H-1¹, CH₂O), 3.95 - 3.10 (m, 24H, H-4², H-4³, H-4¹, H-6a¹, H-6a⁴, H-6b⁴, H-2¹, H-6b¹, H-6a³, H-6a², H-2², H-2³, H-3³, H-3², H-5¹, H-3¹, H-6b³, H-5⁴, H-6b², H-4⁴, H-2⁴, H-3⁴, H-5², H-5³), 1.99 (m, 2H, C(O)CH₂), 1.78-1.74 (m, 9H, NHAc), 1.43 (m, 2H, C(O)CH₂CH₂), 1.21 (m, 24H, (CH₂)₁₂), 0.83 (t, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 171.96, 169.24, 169.09, 168.98 (C=O), 139.39, 139.26, 139.05, 138.62, 138.39 (C-i Ar), 128.13, 127.99, 127.77, 127.70, 127.32, 127.22, 127.15, 127.10, 127.06, 126.96, 126.86, 126.70 (C-Ar), 100.01 (C-1³), 99.95 (C-1²), 96.58 (C-1⁴), 88.01 (C-1¹), 82.21 (C-5⁴), 80.56 (C-3³), 80.50 (C-3²), 80.48 (C-3¹), 76.35 (C-5¹), 75.97 (C-3⁴), 75.23 (C-4²), 75.17 (C-4³), 74.81 (C-4¹), 74.75 (C-5²), 74.55 (C-5³), 73.35, 73.18, 73.17, 73.08, 72.44, 72.00, 71.97, 71.91 (CH₂O), 70.43 (C-2⁴), 69.56 (C-6⁴), 69.53 (C-4⁴), 68.28 (C-6¹), 68.26 (C-6²), 68.13 (C-6³), 55.15 (C-2²), 55.04 (C-2³), 53.67 (C-2¹), 35.79 (C(O)CH₂), 31.24 - 22.91 (alkyl-C), 22.23, 22.14, 22.03 (NHAc), 13.88 (CH₃).

O-(3,6-Di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R,S*)-3-(hexadecanoyloxy)-hexadecanoylamido)- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -*D*-glucopyranosylazid **91**

550 mg (1.07 mmol) (*R,S*)-3-(hexadecanoyloxy)-hexadecansäure **89** werden in 6.0 ml NMP gelöst. Die klare Lösung wird mit 163 mg (1.07 mmol) HOBt und 343 mg (1.07 mmol) TBTU versetzt und mit ca. 700 μ l DIPEA auf pH 9 eingestellt. Anschließend werden 820 mg (0.53 mmol) Amin **84** zu der Kupplungslösung gegeben. Nach 12 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (2.3 g braunes Öl) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 45 mm, Füllhöhe: 13 cm, Dichlormethan / Methanol, 70:1 \Rightarrow 50:1). Zur weiteren Reinigung wird die Substanz in 7 ml Methanol gelöst; durch tropfenweise Zugabe von 3 ml Wasser unter Rühren wird eine Suspension erzeugt, die auf eine SepPak-Kartusche aufgetragen wird. Die Trennung erfolgt durch einen Methanol / Wasser-Gradienten: man eluiert mit je 20 ml 50 %, 66 %, 75 %, 85 %, 95 % Methanol in Wasser sowie mit reinem Methanol. Das Produkt eluiert bei 95 % Methanol in Wasser; diese Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 480 mg (44 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.68$ (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

$[\alpha]_D^{23} = -41.5^\circ$ (0.7, Dichlormethan),

$C_{118}H_{159}N_7O_{22}$ (2027.56),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 2026.15$; $M_{\text{gef}} = 2049.15$ ($M+Na$) $^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 8.10 - 7.85$ (m, 4H, NH), 7.37 – 7.03 (m, 40H, Ar), 5.37 (d, $J_{1,2} = 6.80$ Hz, 1H, H-1 A), 5.10 (m, 1H, H-3 A), 4.95 – 4.72 (m, 4H, CH₂O), 4.60 – 4.25 (m, 15H, 1 2 , 1 1 , 1 3 , CH₂O), 3.90 – 3.07 (m, 24H, H-4 1 , H-4 2 , H-4 3 , H-6a 1 , H-6a 4 , H-2 1 , H-6b 1 , H-6a 2 , H-6a 3 , H-2 2 , H-3 2 , H-2 3 , H-5 1 , H-3 1 , H-3 3 , H-5 4 , H-6b 2 , H-6b 3 , H-6b 4 , H-4 4 , H-2 4 , H-3 4 , H-5 2 , H-5 3), 2.42 – 1.95 (m, 4H, H-2a A , H-2b A , H-2a $^{A'}$, H-2b $^{A'}$), 1.79 - 1.74 (m, 9H, NHAc), 1.56 – 0.98 (m, 50H, H-3 A , alkyl-CH₂), 0.86 (t, 6H, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 170.32 - 168.96$ (C=O), 128.16 - 126.72 (C-Ar), 99.59 (C-1 3), 99.53 (C-1 2), 96.22 (C-1 4), 87.67 (C-1 1), 81.68 (C-5 4), 80.26 (C-3 3), 80.12 (C-

3²), 80.08 (C-3¹), 76.10 (C-5¹), 75.63 (C-3⁴), 74.89 (C-4²), 74.89 (C-4³), 74.49 (C-4¹), 74.40 (C-5²), 74.40 (C-5³), 73.26 – 71.74 (CH₂O), 70.06 (C-2⁴), 69.22 (C-4⁴), 69.15 (C-6⁴), 67.95 (C-6¹), 67.91 (C-6²), 67.91 (C-6³), 54.86 (C-2²), 54.86 (C-2³), 53.31 (C-2¹), 33.76, 33.72, 31.30, 31.29, 29.05 – 28.35, 24.57 – 24.41 (alkyl-C), 22.95, 22.88, 22.76 (NHAc), 22.09, 22.08 (alkyl-C), 13.93, 13.91 (CH₃).

O-(3,6-Di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-palmitoylamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose **92**

1.0 g (0.56 mmol) Azid **90** werden in 20 ml Methanol suspendiert, mit 0.1 ml Triethylamin, 2 ml Dichlormethan und 0.3 ml Propandithiol versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 100 Minuten (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) erfolgt eine weitere Zugabe von 0.4 ml Triethylamin und 0.6 ml Propandithiol. Nach 2 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wird in einem Gemisch aus 10 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 4 ml Wasser suspendiert und bei 50°C gerührt. Nach 1.5 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und dreimal mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (1.33 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 11 cm, Cyclohexan / Aceton, 3:1 \Rightarrow 1:2).

Ausbeute: 684 mg (70 %) amorph,

R_f = 0.60 (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

[α]_D²³ = -22.0° (0.7, Dichlormethan),

C₁₀₂H₁₃₀N₄O₂₁ (1748.14),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 1746.92; M_{gef} = 1769.75 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7.99 – 7.75 (m, 4H, NH), 7.39 – 7.05 (m, 40H, Ar), 6.76 (d, *J*_{1,OH} = 3.97 Hz, 1H, OH-1¹), 5.38 (d, *J*_{1,2} = 6.11 Hz, 1H, H-1⁴), 4.96 – 4.71 (m, 4H, CH₂O, H-1¹), 4.69 – 4.21 (m, 15H, H-1², H-1³, CH₂O), 3.98 – 3.03 (m, 24H, H-2¹, H-4², H-4³, H-4¹, H-5¹, H-6a¹, H-6a², H-6a³, H-3¹, H-6b¹, H-3², H-2², H-3³, H-2³, H-6a⁴, H-6b⁴, H-5⁴,

H-6b², H-6b³, H-4⁴, H-2⁴, H-3⁴, H-5², H-5³), 1.99 (m, 2H, C(O)CH₂), 1.81-1.74 (m, 9H, NHAc), 1.44 (m, 2H, C(O)CH₂CH₂), 1.22 (m, 24H, (CH₂)₁₂), 0.85 (t, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 172.00, 169.11, 169.02 (C=O), 139.51, 139.41, 139.32, 139.14, 138.71, 138.68, 138.65, 138.57, 138.52 (C-i Ar), 128.14, 128.03, 127.85, 127.83, 127.81, 127.75, 127.71, 127.64, 127.35, 127.28, 127.24, 127.21, 127.19, 127.18, 127.13, 127.07, 127.06, 127.00, 126.93, 126.85, 126.79, 126.73, 126.68, 126.66 (C-Ar), 99.83 (C-1²), 99.67 (C-1³), 96.39 (C-1⁴), 90.41 (C-1¹), 81.89 (C-5⁴), 80.30 (C-3²), 80.14 (C-3³), 77.91 (C-3¹), 75.641 (C-3⁴), 75.59 (C-4¹), 74.87 (C-4²), 74.78 (C-4³), 74.46 (C-5³), 74.36 (C-5²), 73.00, 72.84, 72.73, 72.10, 71.71, 71.59, 71.53 (CH₂O), 70.12 (C-2⁴), 69.21 (C-4⁴), 69.20 (C-5¹), 68.90 (C-6⁴), 68.41 (C-6¹), 67.96 (C-6², C-6³), 54.86 (C-2²), 54.73 (C-2³), 52.47 (C-2¹), 35.78 (C(O)CH₂), 31.27 – 22.08 (alkyl-C), 22.98, 22.88, 22.56 (NHAc), 13.94 (CH₃).

O-(3,6-Di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R,S*)-3-(hexadecanoyloxy)-hexadecanoylamido)-β-*D*-glucopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-α,β-*D*-glucopyranose **93**

340 mg (0.17 mmol) Azid **91** werden in 20 ml Methanol gelöst, mit 0.85 ml Triethylamin und 0.85 ml Propandithiol versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 6 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in einem Gemisch aus 16 ml THF, 16 ml Eisessig und 8 ml Wasser suspendiert und bei 40°C gerührt. Nach 3 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird eingeeengt, einmal mit 20 ml Toluol codestilliert, im Hochvakuum getrocknet und lyophilisiert. Die Reinigung des Rohprodukts (0.36 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 10 cm, Essigsäureethylester / Methanol, 60:1).

Ausbeute: 291 mg (86 %) amorph,

R_f = 0.61 (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

[α]_D²³ = -19.7° (0.4, Dichlormethan),

C₁₁₈H₁₆₀N₄O₂₃ (2002.55),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 2001.15; M_{gef} = 2024.17 (M+Na)⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): δ = 8.10 - 7.85 (m, 4H, NH), 7.34 – 7.05 (m, 40H, Ar), 6.76 (d, $J_{1,\text{OH}} = 3.97$ Hz, 1H, OH-1¹), 5.36 (d, 1H, H-1⁴), 5.10 (m, 1H, H-3^A), 4.95 – 4.72 (m, 4H, CH₂O, H-1), 4.63 – 4.25 (m, 15H, 1², 1³, CH₂O), 3.90 – 3.09 (m, 24H, H-2¹, H-4², H-4³, H-4¹, H-5¹, H-6a¹, H-6a², H-6a³, H-3¹, H-6b¹, H-2², H-3², H-3³, H-2³, H-6a⁴, H-6b⁴, H-5⁴, H-6b², H-6b³, H-4⁴, H-2⁴, H-3⁴, H-5², H-5³), 2.42 – 1.95 (m, 4H, H-2a^A, H-2b^A, H-2a^{A'}, H-2b^{A'}), 1.79 - 1.75 (m, 9H, NHAc), 1.52 – 0.99 (m, 50H, H-3^{A'}, alkyl-CH₂), 0.83 (t, 6H, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): δ = 170.52 - 168.92 (C=O), 128.19 - 126.75 (C-Ar), 99.88 (C-1²), 99.63 (C-1³), 96.26 (C-1⁴), 90.50 (C-1¹), 81.62 (C-5⁴), 80.34 (C-3²), 80.11 (C-3³), 77.87 (C-3¹), 75.64 (C-4¹), 75.57 (C-3⁴), 74.90 (C-4²), 74.75 (C-4³), 74.27 (C-5²), 74.27 (C-5³), 73.45 – 71.74 (CH₂O), 70.07 (C-2⁴), 69.18 (C-5¹), 69.18 (C-4⁴), 68.91 (C-6⁴), 68.38 (C-6¹), 67.91 (C-6²), 67.91 (C-6³), 54.88 (C-2²), 54.81 (C-2³), 52.47 (C-2¹), 33.77, 33.72, 31.30, 31.29, 29.07 – 28.36, 24.57 – 24.54 (alkyl-C), 22.96, 22.87, 22.55 (NHAc), 22.10, 22.09 (alkyl-C), 13.93, 13.91 (CH₃).

O-(2-Desoxy-2-palmitoylamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose **94**

500 mg (0.29 mmol) Tetrasaccharid **92** werden in 50 ml Methanol gelöst, mit 2.5 ml Eisessig und 2.2 g Palladiumoxidhydrat (Fa. ABCR) versetzt und bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre heftig gerührt (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1). Da nach 3 Tagen immer noch vier unterschiedliche, aber vergleichbar intensive Spots beobachtet werden (DC: *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1), wird 24 Stunden bei 40°C gerührt. Da nun ein Hauptspot zu erkennen ist, wird zentrifugiert und die klare Lösung vom Katalysator dekantiert. Da das Produkt schlecht löslich ist, wird der Katalysator mit insgesamt ca. 1 Liter Methanol portionsweise gewaschen, die klare Lösung nach Zentrifugation dekantiert und eingengt. Der Feststoff kann in Eisessig suspendiert und lyophilisiert werden. Auf diese Weise werden 70 mg farbloses Pulver erhalten. Da das Produkt noch geringe Mengen von Nebenprodukten enthält und sich nicht vollständig reinigen lässt, wird die NMR-spektroskopische Zuordnung anhand der auf anderem Wege hergestellten identischen Verbindung getroffen.

Ausbeute: 70 mg (24 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.93$ (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 1:1),

$C_{46}H_{82}N_4O_{21}$ (1027.16),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1026.55$; $M_{gef} = 1049.74$ ($M+Na$)⁺.

O-(2-Desoxy-2-((*R,S*)-3-(hexadecanoyloxy)-hexadecanoylamido)- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose **95**

44 mg (21 μ mol) Tetrasaccharid **93** werden in 15 ml Methanol und 0.5 ml Eisessig gelöst, mit 195 mg Palladiumoxidhydrat (Fa. Fluka) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bei 35°C gerührt. Nach 18 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1; *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 8:1) ist das Edukt vollständig umgesetzt und nach der Zentrifugation wird der klare Überstand mit ESI-MS untersucht. Dabei wird das gewünschte Produkt **95**, aber auch geringe Mengen von Verbindung **94** gefunden. Die Charakterisierung wird anhand der auf anderem Wege hergestellten identischen Verbindung getroffen.

O-(2-Amino-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose **97**

954 mg (0.622 mmol) Azid **84** werden in 60 ml absolutem Methanol gelöst, mit 3 ml Triethylamin und 3 ml Propandithiol versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 120 Minuten (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird bei 30°C Wasserbadtemperatur eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird in 10 ml THF, 10 ml Eisessig und 5 ml Wasser gelöst und 30 Minuten bei 40°C gerührt (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1). Es wird eingeeengt, zweimal mit je 20 ml Toluol sowie mit 20 ml Dichlormethan / Methanol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (1.39 g gelber Feststoff) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 9 cm, reiner Essigsäureethylester; nochmalige Reinigung durch Flashchromatographie: Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 18 cm, Dichlormethan / Methanol, 40:1 \Rightarrow 25:1). Wenn bei der Reaktion nach dem ersten Schritt das Propandithiol

nicht vollständig im Hochvakuum entfernt wird, bildet sich im nachfolgenden Schritt nicht nur die gewünschte 1-OH-Verbindung, sondern irreversibel auch ein Dithian unter Ringöffnung des reduzierenden Zuckers.

Ausbeute: nicht bestimmt (s.o.),

R_f -Amin = 0.31 (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

R_f -**97** = 0.60 (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

$[\alpha]_D^{23} = -18.3^\circ$ (0.2, Dichlormethan),

$C_{86}H_{100}N_4O_{20}$ (1509.73),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1508.69$; $M_{gef} = 1509.67$ (M+H)⁺, 1531.68 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.95 - 7.80$ (m, 3H, NHAc), 7.41 – 7.06 (m, 40H, Ar), 4.96 – 4.85 (m, 4H, CH₂O, H-1¹ α), 4.61 – 4.22 (m, 16H, H-1², H-1³, H-1¹ β , H-1⁴, CH₂O), 3.90 – 3.80 (m, 4H, H-4², H-4³, H-4¹, H-2¹), 3.77 – 3.03 (m, 19H, H-6a⁴, H-6a², H-6a¹, H-6a³, H-6b², H-6b¹, H-5¹, H-3¹, H-2², H-3², H-2³, H-3³, H-6b³, H-6b⁴, H-4⁴, H-5⁴, H-5², H-5³, H-3⁴), 2.54 (m, 1H, H-2⁴), 1.82-1.75 (m, 9H, NHAc).

¹³C-NMR(90.56 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.14, 169.13, 169.09$ (NHAc), 139.55, 139.45, 139.35, 139.17, 138.73, 138.57, 138.37 (C-i Ar), 131.75, 131.53, 128.84, 128.66, 128.48, 128.25, 128.19, 128.15, 128.13, 128.10, 128.03, 127.79, 127.71, 127.43, 127.29, 127.22, 127.14, 127.09, 127.01, 126.92, 126.76 (C-Ar), 102.31 (C-1⁴), 99.92 (C-1²), 99.67 (C-1³), 94.94 (C-1¹ β), 90.49 (C-1¹ α), 84.47 (C-3⁴), 80.47 (C-3¹), 80.27 (C-3²), 80.09 (C-3³), 77.82 (C-5¹), 75.79 (C-5⁴), 75.51 (C-4¹), 74.89 (C-4²), 74.89 (C-4³), 74.28 (C-5²), 74.28 (C-5³), 73.80 – 70.92 (CH₂O), 69.93 (C-4⁴), 69.24 (C-6⁴), 68.27 (C-6¹), 67.91 (C-6²), 67.91 (C-6³), 56.71 (C-2⁴), 54.87 (C-2²), 54.69 (C-2³), 52.43 (C-2¹), 22.98, 22.88, 22.57 (NHAc).

O-(2-Amino-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose **99**

65 mg (43.1 μ mol) der benzylierten Verbindung **97** werden in 4 ml Methanol und 0.2 ml Eisessig gelöst, mit 108 mg Palladiumoxidhydrat (Fa. Fluka) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach 22 Stunden (DC: *i*-Propanol / 1M

Ammoniumacetatlösung, 4:1; zusätzlich ESI-MS) wird zentrifugiert, die klare überstehende Lösung dekantiert, eingeeengt und lyophilisiert. Das Rohprodukt (40 mg) wird durch Gelfiltration gereinigt (Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm); Eluens: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss 0.75 ml/min; Detektion: 220 und 254 nm).

Ausbeute: 24.6 mg (73 %) amorpher farbloser Feststoff,

$R_f = 0.19$ (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1),

$[\alpha]_D^{23} = -4.5^\circ$ (0.2, H₂O),

C₃₀H₅₂N₄O₂₀ (788.75),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 788.32$; $M_{\text{gef}} = 811.28$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als internem Standard): $\delta = 7.30 - 7.12$ (m, 3H, NHAc), 4.98 (d, $J_{1,2} = 2.19$ Hz, 0.58H, H-1¹ α), 4.49 (d, $J_{1,2} = 7.91$ Hz, 0.42H, H-1¹ β), 4.39 (d, $J_{1,2} = 7.46$ Hz, 1H, H-1²), 4.38 (d, $J_{1,2} = 8.06$ Hz, 1H, H-1³), 4.29 (d, $J_{1,2} = 8.13$ Hz, 1H, H-1⁴), 3.74 – 3.17 (m, 23H, H-6a², H-6a⁴, H-2¹ α , H-5¹ α , H-3¹ α , H-6a¹ α , H-6a¹ β , H-6b², H-6a³, H-2², H-2³, H-4², H-5², H-6b⁴, H-4³, H-2¹ β , H-4¹ β , H-6b¹ α , H-6b¹ β , H-6b³, H-3¹ β , H-3², H-5³, H-4¹ α , H-5¹ β , H-3³, H-5⁴, H-4⁴, H-3⁴), 2.50 (H-2⁴), 1.86 - 1.84 (m, 9H, NHAc).

¹³C-NMR(90.56 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als internem Standard): $\delta = 175.98$, 175.88, 175.75 (NHAc), 103.75 (C-1⁴), 102.65 (C-1²), 102.65 (C-1³), 96.11 (C-1¹ β), 91.71 (C-1¹ α), 81.20 (C-4¹ α), 80.78 (C-5¹ β), 80.60 (C-5³), 79.35 (C-5²), 77.52 (C-5⁴), 76.65 (C-3⁴), 75.90 (C-3¹ β), 75.90 (C-3²), 75.90 (C-3³), 73.94 (C-4¹ β), 73.46 (C-4³), 73.34 (C-4²), 71.26 (C-3¹ α), 70.91 (C-4⁴), 70.55 (C-5¹ α), 61.87 (C-6⁴), 61.39 (C-6²), 61.33 (C-6¹ α), 61.33 (C-6¹ β), 61.33 (C-6³), 57.92 (C-2⁴), 57.35 (C-2¹ β), 56.37 (C-2²), 56.37 (C-2³), 54.97 (C-2¹ α), 23.73, 23.50 (NHAc).

N-Palmitoyloxysuccinimid **100**

256 mg (1.0 mmol) Palmitinsäure und 138 mg (1.2 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid werden in 5 ml trockenem Dioxan und 5 ml absolutem Dichlormethan gelöst und nach Zugabe von 230 mg (1.2 mmol) EDC·HCl bei Raumtemperatur gerührt. Nach 150 Minuten (DC: Cyclohexan / Essigsäureethylester, 4:1 und 2:1) wird eingeeengt, in Dichlormethan aufgenommen, mit Natriumchloridlösung gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet,

eingengt und im Hochvakuum bis zur Trockne belassen. Die Reinigung des Rohprodukts (330 mg) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 10 cm, *n*-Hexan / Essigsäureethylester, 6:1).

Ausbeute: 230 mg (65 %) amorpher farbloser Feststoff,

$R_f = 0.46$ (*n*-Hexan / Essigsäureethylester, 2:1),

$C_{20}H_{35}NO_4$ (353.50).

1H -NMR (270 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 2.79$ (s, 4H, succinoyl-CH₂), 2.64 (t, 2H, C(O)CH₂), 1.60 (m, 2H, C(O)CH₂CH₂), 1.38 – 1.18 (m, 24H, alkyl-CH₂), 0.84 (t, 3H, CH₃).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 169.71$, 168.52 (C=O), 30.02, 28.70, 28.61, 28.49, 28.37, 28.19, 27.76, 25.19, 24.00, 21.74 (alkyl-CH₂), 13.52 (CH₃).

(R,S)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecanoyloxysuccinimid **101**

511 mg (1.00 mmol) (*R,S*)-3-(Hexadecanoyloxy)-hexadecansäure **89** und 138 mg (1.2 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid werden in 5 ml trockenem Dioxan und 5 ml absolutem Dichlormethan gelöst und nach Zugabe von 230 mg (1.2 mmol) EDC·HCl bei Raumtemperatur gerührt. Nach 135 Minuten (DC: Cyclohexan / Essigsäureethylester, 2:1) wird bei 35°C eingengt, das farblose Öl eingefroren und im Hochvakuum lyophilisiert. Die Reinigung des Rohprodukts (947 mg farbloser Feststoff) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 35 mm, Füllhöhe: 9 cm, *n*-Hexan / Essigsäureethylester, 6:1).

Ausbeute: 543 mg (89 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.61$ (Cyclohexan / Essigsäureethylester, 2:1),

$C_{36}H_{65}NO_6$ (607.90),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{ber} = 607.48$; $M_{gef} = 630.41$ ($M+Na$)⁺.

1H -NMR (270 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.26$ (m, 1H, H-3), 2.85 – 2.78 (m, 6H, H-2a, H-2b, succinoyl-CH₂), 2.29 (m, 2H, H-2a', H-2b'), 1.70 - 1.53 (m, 4H, H-4, H-3'), 1.22 (m, 46H, CH₂), 0.86 (t, 6H, CH₃).

^{13}C -NMR (67.97 MHz, CDCl_3): δ = 173.06, 168.74, 165.51 (C=O), 69.16 (C-3), 35.89 (C-2), 34.25 (C-2'), 33.71 (C-4), 31.88 - 22.63 (Alkyl- CH_2 , succinoyl- CH_2), 14.16 (CH_3).

O-(2-Desoxy-2-palmitoylamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- α , β -D-glucopyranose **94**

9.7 mg (12.29 μmol) der entschützten Verbindung **99** und 17.5 mg (49.50 μmol) *N*-Palmitoyloxysuccinimid **100** werden in 1.0 ml NMP gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 48 Stunden (DC: *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1; zusätzlich ESI-MS) wird eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Gelfiltration gereinigt (Sephadex LH-20 (25 x 1000 mm); Eluens: Methanol; Fluss 1.0 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm).

Ausbeute: 6.90 mg (55 %) farbloser Feststoff,

R_f = 0.83 (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1),

$\text{C}_{46}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_{21}$ (1027.16),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 1026.55; M_{gef} = 1049.49 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

^1H -NMR (360 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 7.32 - 7.19 (m, 4H, NH), 5.07 (m, 1H, H-1 4), 4.95 (m, 0.7H, H-1 $^{1\alpha}$), 4.46 (m, 0.3H, H-1 $^{1\beta}$), 4.40 (m, 2H, H-1 2 , H-1 3), 3.72 – 3.13 (m, 24H, H-2 4 , H-2 $^{1\alpha}$, H-5 $^{1\alpha}$, H-3 $^{1\alpha}$, H-2 2 , H-2 3 , H-6a $^{1\alpha}$, H-6b $^{1\alpha}$, H-6a 2 , H-6b 2 , H-6a 3 , H-6b 3 , H-6a 4 , H-4 2 , H-4 3 , H-2 $^{1\beta}$, H-4 $^{1\beta}$, H-6b 4 , H-4 $^{1\alpha}$, H-5 2 , H-5 3 , H-5 $^{1\beta}$, H-3 $^{1\beta}$, H-3 2 , H-3 3 , H-5 4 , H-3 4 , H-4 4), 2.39 (t, 2H, C(O) CH_2), 1.86 – 1.82 (m, 9H, NHAc), 1.47 (m, 2H, C(O) CH_2CH_2), 1.30 – 1.14 (m, 24H, alkyl- CH_2), 0.81 (t, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (90.56 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 101.40 (C-1 2 , C-1 3), 98.14 (C-1 4), 95.27 (C-1 $^{1\beta}$), 90.09 (C-1 $^{1\alpha}$), 81.09 (C-4 $^{1\alpha}$), 80.96 (C-5 2), 80.55 (C-5 $^{1\beta}$), 80.49 (C-5 3), 76.32 (C-5 4), 74.99 (C-3 $^{1\beta}$), 74.28 (C-3 2 , C-3 3), 74.13 (C-3 4), 72.79 (C-4 $^{1\beta}$), 71.84 (C-4 2 , C-4 3), 70.42 (C-4 4), 69.20 (C-3 $^{1\alpha}$), 68.45 (C-5 $^{1\alpha}$), 60.55 (C-6 4), 59.42 (C-6 $^{1\alpha}$, C-6 2 , C-6 3), 55.57 (C-2 $^{1\beta}$), 54.21 (C-2 2 , C-2 3), 53.52 (C-2 4), 53.07 (C-2 $^{1\alpha}$), 41.20, 35.19 – 21.75 (alkyl- CH_2), 22.48 (NHAc), 13.42 (CH_3).

O-(2-Desoxy-2-((*R,S*)-3-(hexadecanoyloxy)-hexadecanoylamido)- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose **95**

10 mg (12.68 μ mol) der entschützten Verbindung **99** und 31 mg (50.72 μ mol) (*R,S*)-3-(Hexadecanoyloxy)hexadecanoyloxysuccinimid **101** werden in 1.0 ml NMP gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 96 Stunden (DC: *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 2:1 und 4:1; zusätzlich ESI-MS) wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Gelfiltration gereinigt (Sephadex LH-20 (25 x 1000 mm); Eluens: Methanol; Fluss 1.0 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm). Aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindung wird das Rohprodukt jeweils in 2 ml Methanol verteilt, die Suspension zentrifugiert und der klare Überstand durch Gelfiltration gereinigt. Nach 5 Läufen werden 3.60 mg farbloser Feststoff erhalten; dies entspricht jedoch nicht der gesamten Reaktionsausbeute.

Ausbeute: 3.60 mg farbloser Feststoff (zusätzlich weiteres Rohprodukt),

$R_f = 0.89$ (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1),

$C_{62}H_{112}N_4O_{23}$ (1281.57),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1280.77$; $M_{gef} = 1303.88$ ($M+Na$)⁺.

8.14 Versuche zu Kapitel 5.3.2

O-(2-Acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **102**

1. Entschützung

2.38 g (1.37 mmol) Tetrasaccharid **83** werden in 100 ml absolutem Methanol gelöst, mit 5 ml Ethylendiamin versetzt und bei 50°C gerührt. Nach 17 Stunden (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird eingeeengt und dreimal mit je 10 ml Toluol codestilliert.

$R_f = 0.67$ (Dichlormethan / Methanol, 10:1)

2. Acylierung

Der ölige Rückstand (3.61 g) wird in 40 ml Pyridin und 20 ml Essigsäureanhydrid aufgenommen und bei 50°C gerührt. Nach 24 Stunden wird eingeeengt, dreimal mit je 20 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum bis zur Trockne belassen.

3. Deacetylierung

Der Rückstand wird in 150 ml Methylamin (41 % in Wasser) und 30 ml Methanol suspendiert. Erst nach Zugabe von 20 ml THF entsteht eine klare Lösung. Nach zwei Stunden wird eingeeengt, dreimal mit je 20 ml Toluol codestilliert und im Hochvakuum bis zur Trockne belassen. Die Reinigung des Rohprodukts (braunes Öl) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 45 mm, Füllhöhe: 13 cm, Essigsäureethylester / Methanol, 90:1).

Ausbeute: 1.27 g (60 %) farbloser Feststoff,

$R_f = 0.62$ (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

$[\alpha]_D^{23} = -51.1^\circ$ (0.4, Dichlormethan),

$C_{88}H_{101}N_7O_{20}$ (1576.78),

ESI-MS (Methanol): $M_{ber} = 1575.71$; $M_{gef} = 1598.75$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.02 - 7.95$ (m, 4H, NHAc), 7.32 - 7.10 (m, 40H, Ar), 4.94 – 4.23 (m, 20H, CH₂O, H-1², H-1³, H-1¹, H-1⁴), 3.92 – 3.10 (m, 24H, H-4¹, H-4², H-4³, H-6a¹, H-6b¹, H-6a⁴, H-2¹, H-6a², H-6a³, H-2², H-2³, H-5¹, H-3², H-3³, H-3¹, H-2⁴, H-6b², H-6b³, H-3⁴, H-6b⁴, H-4⁴, H-5⁴, H-5², H-5³), 1.90 - 1.76 (m, 12H, NHAc).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.33 - 169.06$ (C=O), 139.36 – 138.54 (C-i Ar), 128.60 - 126.60 (C-Ar), 99.69 (C-1², C-1³), 99.62 (C-1⁴), 87.74 (C-1¹), 82.03 (C-3⁴), 80.17 (C-3¹, C-3², C-3³), 76.03 (C-5¹), 75.62 (C-5⁴), 74.64 (C-4², C-4³), 74.53 (C-4¹), 74.24 (C-5², C-5³), 73.54 – 68.16 (CH₂O), 70.12 (C-4⁴), 69.21 (C-6⁴), 67.96 (C-6¹), 67.90 (C-6², C-6³), 54.82 (C-2², C-2³, C-2⁴), 53.31 (C-2¹), 22.98 – 21.06 (NHAc).

O-(2-Acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-1-desoxy-1-palmitoylamido- β -D-glucopyranosid **103**

1. Azidreduktion

0.56 g (355 μ mol) Tetrasaccharidazid **102** werden unter Argon in 30 ml Methanol gelöst, mit 2.1 ml Propandithiol und 0.7 ml Triethylamin versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2.5 Stunden werden weitere 0.3 ml Triethylamin und 0.5 ml Propandithiol, nach einer weiteren Stunde nochmals 0.5 ml Triethylamin zugegeben. Nach insgesamt 4 Stunden wird das Reaktionsgemisch in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Hochvakuum lyophilisiert.
 $R_f = 0.23$ (Dichlormethan / Methanol, 10:1)

2. Herstellung der Kupplungslösung

270 mg (1.05 mmol) Palmitinsäure werden in 6 ml DMF gelöst. Die klare Lösung wird mit 163 mg (1.07 mmol) HOBt und 342 mg (1.07 mmol) TBTU versetzt und mit DIPEA auf pH 9 eingestellt.

3. Kupplung des Aminosuckers mit Palmitinsäure

Zu dem Produkt aus 1) wird die Kupplungslösung aus 2) gegeben. Nach 5 Minuten (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird vollständiger Umsatz erhalten. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 ml Methylamin (41 % in H₂O) abgebrochen, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (1.52 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 45 mm, Füllhöhe: 10 cm, Essigsäureethylester / Methanol, 60:1).

Ausbeute: 0.44 g (69 %) leicht gelblicher Feststoff,

$R_f = 0.37$ (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

$[\alpha]_D^{25} = -26.9^\circ$ (0.4, Dichlormethan),

C₁₀₄H₁₃₃N₅O₂₁ (1789.19),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 1787.95$; $M_{\text{gef}} = 1811.04$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.31 - 7.86$ (m, 5H, NH), 7.35 – 6.96 (m, 40H, Ar), 5.38 (d, $J_{1,2} = 6.28$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.98 – 4.20 (m, 19H, H-1¹, CH₂O, H-1², H-1³), 3.91 – 3.08

(m, 24H, H-4¹, H-4², H-4³, H-2¹, H-6a⁴, H-6a², H-6a³, H-6a¹, H-6b¹, H-3², H-3³, H-2², H-3¹, H-2³, H-6b², H-6b³, H-5⁴, H-5¹, H-6b⁴, H-4⁴, H-2⁴, H-3⁴, H-5², H-5³), 2.68 (s, 3H, NHAc), 2.20 – 1.95 (m, 2H, C(O)CH₂), 1.80-1.71 (m, 9H, NHAc), 1.44 (m, 2H, C(O)CH₂CH₂), 1.21 (m, 24H, (CH₂)₁₂), 0.84 (t, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (90.56 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 172.62, 169.29, 169.02 (C=O), 139.35, 139.21, 138.63, 138.48 (C-i Ar), 128.07, 128.00, 127.93, 127.77, 127.71, 127.32, 127.25, 127.11, 126.97, 126.91, 126.77, 126.68 (C-Ar), 99.60 (C-1³), 99.36 (C-1²), 96.21 (C-1⁴), 82.04 (C-5⁴), 81.23 (C-3¹), 80.19 (C-3², C-3³), 78.17 (C-1¹), 75.78 (C-5¹), 75.63 (C-3⁴), 74.82 (C-4², C-4³), 74.32 (C-4¹), 74.24 (C-5², C-5³), 73.50 – 71.78 (CH₂O), 70.13 (C-2⁴), 69.94 (C-4⁴), 69.17 (C-6⁴), 68.12 (C-6¹), 67.86 (C-6², C-6³), 54.98 (C-2²), 54.80 (C-2³), 52.88 (C-2¹), 35.08 (C(O)CH₂), 31.25 – 22.04 (alkyl-C), 22.90 – 22.85 (NHAc), 13.89 (CH₃).

O-(2-Acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-1-desoxy-1-((*R,S*)-3-(hexadecanoyloxy)-hexadecanoylamido)-β-*D*-glucopyranosid **104**

1. Azidreduktion

0.56 g (355 μmol) Tetrasaccharidazid **102** werden unter Argon in 30 ml Methanol gelöst, mit 2.1 ml Propandithiol und 0.7 ml Triethylamin versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2.5 Stunden werden weitere 0.3 ml Triethylamin und 0.5 ml Propandithiol, nach einer weiteren Stunde nochmals 0.5 ml Triethylamin zugegeben. Nach insgesamt 4 Stunden wird das Reaktionsgemisch in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Hochvakuum lyophilisiert.

R_f = 0.23 (Dichlormethan / Methanol, 10:1)

2. Herstellung der Kupplungslösung

550 mg (1.08 mmol) Acyloxyacylverbindung **89** werden in 6 ml DMF gelöst. Es werden 163 mg (1.07 mmol) HOBt und 342 mg (1.07 mmol) TBTU zugegeben und mit DIPEA auf pH 9 eingestellt.

3. Kupplung des Aminozuckers mit Acyloxyacylverbindung **89**

Zu dem Produkt aus 1) wird die Kupplungslösung aus 2) gegeben. Nach 5 Minuten (DC: Dichlormethan / Methanol, 10:1) wird vollständiger Umsatz erhalten. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 ml Methylamin (41 % in H₂O) abgebrochen, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (1.83 g) erfolgt durch Flashchromatographie (Säulendurchmesser: 45 mm, Füllhöhe: 10 cm, *n*-Hexan / Essigsäureethylester, 1:1 => 1:50).

Ausbeute: 0.48 g (66 %) gelblicher Feststoff,

R_f = 0.50 (Dichlormethan / Methanol, 10:1),

[α]_D²⁵ = -25.1° (0.6, Dichlormethan),

C₁₂₀H₁₆₃N₅O₂₃ (2043.60),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 2042.17; M_{gef} = 2065.59 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.43 - 7.88 (m, 5H, NH), 7.38 – 6.98 (m, 40H, Ar), 5.39 (d, J_{1,2} = 6.40 Hz, 1H, H-1⁴), 5.09 – 4.21 (m, 19H, CH₂O, H-1¹, H-1², H-1³), 3.95 – 3.10 (m, 24H, H-4¹, H-4², H-4³, H-2¹, H-6a⁴, H-6a², H-6a³, H-6a¹, H-6b¹, H-3², H-3³, H-2², H-2³, H-3¹, H-6b², H-6b³, H-5⁴, H-5¹, H-6b⁴, H-4⁴, H-2⁴, H-3⁴, H-5², H-5³), 2.68 (s, 3H, NHAc), 2.38 – 2.12 (m, 4H, alkyl-CH), 1.80-1.71 (m, 9H, NHAc), 1.47 (m, 5H, alkyl-CH), 1.21 (m, 46H, (CH₂)₂₃), 0.83 (t, 6H, CH₃).

¹³C-NMR (90.56 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 172.10, 172.03, 169.34, 169.28, 168.99 (C=O), 139.35, 139.25, 139.17, 138.63, 138.46 (C-i Ar), 128.04, 127.97, 127.91, 127.76, 127.68, 127.31, 127.25, 127.10, 126.96, 126.89, 126.76, 126.67 (C-Ar), 99.70 (C-1³), 99.30 (C-1²), 96.22 (C-1⁴), 81.96 (C-5⁴), 81.30 (C-3¹), 80.18 (C-3², C-3³), 77.96 (C-1¹), 75.77 (C-5¹), 75.62 (C-3⁴), 74.85 (C-4², C-4³), 74.25 (C-5², C-5³), 74.14 (C-4¹), 73.49 – 71.87 (CH₂O), 70.04 (C-2⁴), 69.91 (C-4⁴), 69.16 (C-6⁴), 68.33 (C-6¹), 67.84 (C-6², C-6³), 54.93 (C-2²), 54.73 (C-2³), 52.80 (C-2¹), 33.73 – 22.06 (alkyl-C), 22.90 – 22.60 (NHAc), 13.85 (CH₃).

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy-1-desoxy-1-palmitoylamido- β -D-glucopyranosid **105**

56 mg (31.3 μ mol) Tetrasaccharid **103** werden in 12 ml Methanol gelöst, mit 0.6 ml Eisessig und 120 mg PdO \cdot H₂O versetzt und bei Raumtemperatur unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach 16 Stunden (DC: *i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1; zusätzlich ESI-MS) wird abzentrifugiert und der Katalysator zweimal mit Methanol gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt (19.7 mg) wird durch Gelfiltration gereinigt (Sephadex LH-20 (25 x 1000 mm); Eluens: Methanol; Fluss 1.0 ml/min; Detektion: 214 und 254 nm). Aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindung wird das Rohprodukt jeweils in 2 ml Methanol verteilt, die Suspension zentrifugiert und der klare Überstand durch Gelfiltration gereinigt. Nach 5 Läufen werden 2.28 mg farbloser Feststoff erhalten; dies entspricht jedoch nicht der gesamten Reaktionsausbeute.

Ausbeute: 2.28 mg farbloser Feststoff (zusätzlich weiteres Rohprodukt),

R_f = 0.59 (*i*-Propanol / 1M Ammoniumacetatlösung, 4:1),

C₄₈H₈₅N₅O₂₁ (1068.21),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 1067.57; M_{gef} = 1090.83 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.24 - 7.47 (m, 5H, NH), 5.16 (m, 1H, H-1⁴), 4.82 (m, 1H, H-1¹), 4.41 – 4.35 (m, 2H, H-1², H-1³), 3.80 – 3.12 (m, 24H, H-3¹, H-2¹, H-6, H-2⁴, H-6, H-2³, H-6, H-4², H-4³, H-2², H-4¹, H-6, H-5⁴, H-5¹, H-3², H-3³, H-5², H-5³, H-3⁴, H-4⁴), 2.13 (t, 2H, C(O)CH₂), 1.87 – 1.74 (m, 12H, NHAc), 1.45 – 1.15 (m, 26H, alkyl-CH₂), 0.85 (t, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (90.56 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 101.62 (C-1³), 101.52 (C-1²), 97.18 (C-1⁴), 81.29 (C-5², C-5³), 80.69 (C-5¹), 78.28 (C-1¹), 76.57 (C-3⁴), 75.92 (C-5⁴), 74.57 (C-3², C-3³), 72.15 (C-4², C-4³), 71.47 (C-4¹), 70.28 (C-4⁴), 68.00 (C-3¹), 60.18 – 59.43 (C-6¹, C-6², C-6³, C-6⁴), 55.52 (C-2²), 54.22 (C-2³), 53.52 (C-2⁴), 51.63 (C-2¹), 34.95, 30.99 – 21.62 (alkyl-CH₂), 22.59 (NHAc), 13.63 (CH₃).

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy-1-desoxy-1-((R,S)-3-(hexadecanoyloxy-)hexadecanoylamido)- β -D-glucopyranosid **106**

34 mg (16.8 μ mol) Tetrasaccharid **104** werden in 15 ml Methanol gelöst, mit 0.1 ml Eisessig und 77 mg PdO*H₂O versetzt und unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden (Reaktionskontrolle durch ESI-MS) wird abzentrifugiert und der Katalysatorrückstand zweimal mit Methanol und zweimal mit *N*-Methylpyrrolidon gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 16.1 mg (nicht weiter gereinigtes Rohprodukt) farbloser Feststoff,

C₆₄H₁₁₅N₅O₂₃ (1322.62),

ESI-MS (Methanol): M_{ber} = 1321.80; M_{gef} = 1344.87 (M+Na)⁺.

9. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Carlo Unverzagt für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die sehr interessante, vielseitige Themenstellung.

Weiterhin verdienen besondere Erwähnung:

Dr. *Werner Spahl* und *Reinhard Seidl* für die Aufnahme von ESI- und FAB-Massenspektren.

Claudia Dubler und Dr. *David Stephenson* für die Aufnahme von NMR Spektren.

Michael Gläßner für die Aufnahme von EI- und FAB-Massenspektren.

Daniel Ruckdeschel, *Gislinde Gundel*, *Ralf Schuberth*, *Stefano Mezzato*, *Sabine Reicheneder* und *Melanie Schnabel* für die Aufnahme der NMR-Spektren an den Bruker Avance 360 und Bruker Avance DRX-500-FT-Spektrometern.

Harald Weiß, *Xaver Schratt* und *Stefano Mezzato* für die Aufnahme der ESI-Massenspektren an dem Micromass LCT-Spektrometer und *Xaver Schratt* speziell für die Aufnahme der Massenspektren an dem Bruker Reflex III MALDI-TOF-MS.

Gislinde Gundel und *Manuela Schaffrath* für die Einweisung und Hilfe bei den HPLC-Trennungen.

Bettina Hoffmann für die Einweisung am Perkin-Elmer Polarimeter.

Dr. *Gundula Voss* für zahlreiche Tips und Diskussionen, v.a. zur „klassischen“ Chemie.

Sabine Metzner, *Nikolaus Antonakis*, *Sandra Leuschner* und *Jörg Kastner* für die Hilfe im Laboralltag.

Annette Behr und *Traudl Herold* für die Sekretariatsdienste und vielen „Kleinigkeiten“.

Alle „guten Geister“, durch die der Arbeitsbetrieb am Laufen bleibt, insbesondere *Markus Püttner*.

Dr. *Gerhard Kretzschmar*, Aventis, für das Gebiet der NOD-Faktoren, hilfreiche Diskussionen und die Ermöglichung der Fortbildung in Bielefeld.

Prof. Dr. *Peter Morys* für Diskussionen zu den Molekülberechnungen.

Dr. *Jochen Balbach* und *Markus Zeeb* für Hilfe bei NMR-Experimenten bzw. Geräteproblemen außerhalb normaler Arbeitszeiten.

Dr. *Bernhard Winkler*, *Helena Riffel* und *Klaus Küfner* vom Rechenzentrum Bayreuth für die kompetente und rasche Unterstützung.

Mein Arbeitsplatzkollege *Harald Weiß* für die angenehme Atmosphäre während der gemeinsamen Jahre.

Meine Praktikanten *Daniela Dressel, Volker Engel, Yvonne Immig, Aykut Karakuzu, Thomas Lux, Birgit Neuner, Andre Peschel, Georg Rapp, Stefan Reber, Xaver Schratt, Tim Schuhmann* und *Tamasz Stadler*, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Melanie Schnabel, Xaver Schratt und *Sabine Reicheneder* für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Meine Kolleginnen und Kollegen aus München und Bayreuth, durch die ein sehr angenehmes und freundschaftliches Klima im Arbeitskreis herrschte.

10. Literaturverzeichnis

- [1] a) T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 785-838.
b) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [2] J. C. Paulson, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 272-276.
- [3] *Lectin Blocking*, Proceedings of the Intern. Symposium Otzenhausen May 8-9, Gustav Fischer Verlag **1993**.
- [4] *Complex Carbohydrates in Drug Research*, Proc. of the Alfred Benzon Symposium 36, Munksgaard **1993**.
- [5] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- [6] *Glyco- and Cellbiology*, 44. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie 22.-24. April 1993 in Mosbach/Baden, Springer Verlag **1994**.
- [7] *Glycoproteins and Disease*, New Comprehensive Biochemistry, Elsevier, **30**, **1996**.
- [8] D. G. Large, C. D. Warren, *Glycopeptides and Related Compounds*, Marcel Dekker, New York **1997**.
- [9] *Chemical Reviews* **2002**, *102*(2).
- [10] T. S. Raju, P. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*(23), 14090-14098.
- [11] K. C. Nicolaou, N. J. Brokovich, D. R. Carcanague, C. W. Hummel, L. F. Even, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8701-8702.
- [12] a) L. X. Wang, C. Li, Q. W. Wang, Y. Z. Hui, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*(48), 7763-7766.
b) L. X. Wang, C. Li, Q. W. Wang, Y. Z. Hui, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1994**, (6), 621-628.
- [13] D. Tailler, J. C. Jacquinet, J. M. Beau, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1827-1828.
- [14] a) S. Ikeshita, A. Sakamoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(19), 3123-3126.
b) S. Ikeshita, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*(3), 257-261.
c) S. Ikeshita, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1995**, *266*(2), C1-C6.
- [15] a) Übersicht: H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 184-201.
b) Übersicht: H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 851-857.

- c) H. Paulsen, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 289-313.
- [16] a) T. Ogawa, M. Sugimoto, T. Kitajima, K. K. Sadozai, T. Nukada, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5739-5742.
- b) F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1990**, 201, 31-50.
- c) Y. Nakahara, S. Shibayama, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 67-84.
- [17] a) J. Arnarp, M. Haraldsson, J. Lönnngren, *Carbohydr. Res.* **1981**, 97, 307-313.
- b) J. Arnarp, J. Lönnngren, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1981**, 2070-2074.
- c) J. Arnarp, M. Haraldsson, J. Lönnngren, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1982**, 1841-1844.
- [18] a) S. H. Tahir, O. Hindsgaul, *Can. J. Chem.* **1986**, 64, 1771-1780.
- b) K. J. Kaur, O. Hindsgaul, *Glycoconjugate J.* **1991**, 8, 90-94.
- c) K. J. Kaur, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1992**, 226, 219-231.
- [19] J. R. Merritt, E. Naisang, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4443-4449.
- [20] P. Grice, S. V. Ley, J. Pietruszka, H. W. M. Priepe, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 206-208.
- [21] a) J. G. van der Ven, J. Kerekgyarto, J. P. Kamerling, A. Liptak, J. F. Vliegenhart, *Carbohydr. Res.* **1994**, 264, 45-62.
- b) J. Kerekgyarto, J. G. van der Ven, J. P. Kamerling, A. Liptak, J. F. Vliegenhart, *Carbohydr. Res.* **1993**, 238, 135-145.
- c) J. Kerekgyarto, J. P. Kamerling, J. B. Bouwstra, J. F. Vliegenhart, A. Liptak, *Carbohydr. Res.* **1989**, 186, 51-62.
- [22] T. Ogawa, M. Sugimoto, T. Kitajima, K. K. Sadozai, T. Nukada, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5739-5742.
- [23] J. Seifert, M. Lergenmuller, Y. Ito, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39(3), 531-534.
- [24] C. Unverzagt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35(20), 2350-2353.
- [25] C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(32), 5627-5630.
- [26] S. Andre, C. Unverzagt, S. Kojima, X. Dong, C. Fink, K. Kayser, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8(6), 845-855.
- [27] J. Seifert, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(45), 7857-7860.
- [28] C. Unverzagt, *Carbohydr. Res.* **1998**, 305(3-4), 423-431.
- [29] C. Unverzagt, J. Seifert, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41(23), 4549-4553.

- [30] N. Sharon, H. Lis, *Chem. Eng. News* **1981**, 59(13), 21-44.
- [31] E. G. Berger, E. Buddecke, J. P. Kamerling, A. Kobata, J. C. Paulson, J. F. G. Vliegthart, *Experientia*, **1982**, 38, 1129-1162.
- [32] W. Tanner, *Glyco- and Cellbiology*, Springer Verlag **1994**, 81-89.
- [33] B. D. Hames, N. M. Hooper, J. D. Houghton, *Instant Notes in Biochemistry*, BIOS Scient. Pub. Lim. **1997**.
- [34] H. Schachter, *Biochem. Cell. Biol.* **1986**, 64, 163-181.
- [35] I. Brockhausen, *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1473, 67-95.
- [36] B. Lowe, A. Varki, *Essent. Glycobiol.* **1999**, 253-266.
- [37] I. Brockhausen, *New Compr. Biochem.* **1995**, 201-259.
- [38] N. M. Hooper, *Proteomics* **2001**, 1, 748-755.
- [39] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 631-634.
- [40] R. Tauber, B. Volz, W. Kreisel, N. Loch, G. Orberger, H. Xu, R. Nuck, W. Reuter, "Reprocessing of Membrane Glycoproteins", *Glyco- and Cellbiology*, Springer-Verlag **1994**, 119-130.
- [41] G. Fischer, F. X. Schmid, *Biochemistry* **1990**, 29, 2205-2212.
- [42] F. U. Farthl, "Function of Molecular Chaperones in Protein Folding", *Glyco- and Cellbiology*, Springer-Verlag **1994**, 185-194.
- [43] Römpp Lexikon Biotechnologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1992**, S. 152 "Chaperonine".
- [44] Römpp Lexikon Biotechnologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1992**, S. 368 "Hitzeschock-Proteine".
- [45] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay, *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Vol 3-4*, Wiley-VCH, **2000**.
- [46] H. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* **1986**, 64, 163-181.
- [47] T. S. Raju, P. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271(13), 7484-7493.
- [48] T. S. Raju, M. K. Ray, P. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270(51), 30294-30302.
- [49] P. Stanley, T. S. Raju, M. Bhaumik, *Glycobiology* **1996**, 6(7), 695-699.
- [50] B. Lowe, A. Varki, *Essent. Glycobiol.* **1999**, 57-68.
- [51] U. G. Danilczyk, M. F. Cohen-Doyle, D. B. Williams, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275(17), 13089-13097.
- [52] J. Ellgaard, A. Helenius, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, 13(4), 431-437.

- [53] a) F. E. Ware, A. Vassilakos, P. A. Peterson, M. R. Jackson, M. A. Lehrmann, D. B. Williams, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 4697-4704.
b) A. Vassilakos, M. Michalak, M. A. Lehrmann, D. B. Williams, *Biochemistry* **1998**, 37, 3480-3490.
- [54] A. Helenius, *Mol. Biol. Cell* **1994**, 5(3), 253-65.
- [55] F. H. Routier, M. J. Davies, K. Bergemann, E. F. Hounsell, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14(2), 201-207.
- [56] R. Malhotra, M. R. Wormald, P. Rudd, P. B. Fischer, R. A. Dwek, R. B. Sim, *Nat. Med. (N. Y.)* **1995**, 1(3), 237-43.
- [57] T. Mizuochi, T. J. Matthews, M. Kato, J. Hamako, K. Titani, J. C. Solomon, T. Feizi, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 8519-8524.
- [58] T. Mizuochi, M. W. Spellman, M. Larkin, J. C. Solomon, L. J. Basa, T. Feizi, *Biochem. J.* **1988**, 254, 599-603.
- [59] J. W. Dennis, M. Granovsky, C. E. Warren, *Biochim. Biophys. A.* **1999**, 1473, 21-34.
- [60] S. I. Hakomori, *Cancer Res.* **1996**, 56, 5309-5318.
- [61] A. Kobata, *Glycoconj. J.* **1998**, 15, 323-331.
- [62] S. Yqgel, R. Feinmesser, C. Waghorne, P. K. Lala, M. L. Breitmann, J. W. Dennis, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 685-690.
- [63] a) P. E. Goss, J. Baptiste, B. Fernandes, M. Baker, J. W. Dennis, *Cancer Res.* **1994**, 54, 1450-1457.
b) P. E. Goss, C. L. Reid, D. Bailey, J. W. Dennis, *Clin. Cancer Res.* **1997**, 3, 1077-1086.
- [64] R. Takano, E. A. Muchmore, J. W. Dennis, *Glycobiology* **1994**, 4, 665-674.
- [65] N. W. Lo, J. W. Dennis, J. T. Y. Lau, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 264, 619-621.
- [66] H. Yamamoto, Y. Kaneko, A. Rebbaa, E. G. Bremer, J. R. Moskal, *J. Neurochem.* **1997**, 68, 2566-2576.
- [67] J. Finne, M. M. Burger, J. P. Prieels, *J. Cell Biol.* **1982**, 92, 277-282.
- [68] E. Gorelik, F. Xu, T. Henion, F. Anaraki, U. Galili, *Cancer Res.* **1997**, 57, 332-336.
- [69] Römpp Chemie Lexikon, „Cellulose“, 9. Aufl., Georg Thieme Verlag, **1995**.
- [70] H. P. Sapink, B. J. J. Lugtenberg, *Plant Mol. Biol.* **1994**, 26, 1413-1422.

- [71] Karsten Niehaus, Anke Becker, Subcellular Biochemistry, Vol. 29: Plant-Microbe Interactions, chapter 3.
- [72] Dieter Kapp, *Dissertation*, Universität Bielefeld, **1996**.
- [73] H. P. Spaink, *Critical Reviews in Plant Sciences* **1996**, 15(5&6), 559-582.
- [74] J. W. Kijne, M. A. Bauchrowitz, C. L. Diaz, *Plant. Physiol.* **1997**, 115, 869-873.
- [75] J. Denarie, F. Debelle, J. C. Prome, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 503-535.
- [76] M. Schultze, A. Kondorosi, *Curr. Opinion in Genetics & Development* **1996**, 6, 631-638.
- [77] N. P. J. Price, *Carb. Res.* **1999**, 317, 1-9.
- [78] P. Mergaert, M. V. Montagu, J. C. Prome, M. Holsters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1551-1555.
- [79] P. Mergaert, M. Van Montagu, M. Holsters, *Mol. Microbiol.* **1997**, 25(5), 811-817.
- [80] Z. Lorkiewicz, *Acta Biochim. Pol.* **1997**, 44(1), 1-12.
- [81] R. Catoira, C. Galera, F. de Billy, R. V. Penmetsa, E. P. Journet, F. Maillet, C. Rosenberg, D. Cook, C. Gough, J. Denarie, *The Plant Cell* **2000**, 12, 1647-1665.
- [82] P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Prome, J. Denarie, *Nature* **1990**, 344, 781-784.
- [83] N. Demont, M. Ardourel, F. Maillet, D. Prome, M. Ferro, J. C. Prome, J. Denarie, *EMBO J.* **1994**, 13, 2139-2149.
- [84] N. Demont-Caulet, F. Maillet, D. Tailler, J. C. Jacquinet, J. C. Prome, K. C. Nicolaou, G. Truchet, J. M. Beau, J. Denarie, *Plant Physiol.* **1999**, 120, 83-92.
- [85] K. A. Brozek, R. W. Carlson, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271(50), 32126-32136.
- [86] T. W. Gadella, G. Vereb, A. E. Hadri, H. Rohrig, J. Schmidt, M. John, J. Schell, T. Bisseling, *Biophys. J.* **1997**, 72, 1986-1996.
- [87] L. Cardenas, L. Vidali, J. Dominguez, H. Perez, F. Sanchez, P. K. Hepler, C. Quinto, *Plant Physiol.* **1998**, 116, 871-877.
- [88] G. E. D. Oldroyd, *Ann. of Botany* **2001**, 87, 709-718.
- [89] F. G. P. Lhuissier, N. C. A. Ruijter, B. J. Sieberer, J. J. Esseling, A. M. C. Emons, *Ann. of Botany* **2001**, 87, 289-302.
- [90] J. L. Pingret, E. P. Journet, D. G. Barker, *The Plant Cell* **1998**, 10, 659-671.
- [91] J. V. Cullimore, R. Ranjeva, J. J. Bono, *Trends in Plant Science* **2001**, 6(1), 24-30.

- [92] S. Philip-Hollingsworth, F. B. Dazzo, R. I. Hollingsworth, *J. Lipid Res.* **1997**, *38*, 1229-1241.
- [93] S. Philip-Hollingsworth, G. Orgambide, J. J. Bradford, D. K. Smith, R. I. Hollingsworth, F. B. Dazzo, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20968-20977.
- [94] G. Orgambide, S. Philip-Hollingsworth, P. F. Mateos, R. I. Hollingsworth, F. B. Dazzo, *Plant Soil.* **1996**, *186*, 93-98.
- [95] G. V. Bloemberg, B. J. J. Lugtenberg, *Curr. Op. in Plant Biol.* **2001**, *4*, 343-350.
- [96] C. Unverzagt, *Habilitationsschrift*, Technische Universität München, **1997**.
- [97] I. Prahl, *Diplomarbeit*, Ludwig-Maximilians-Universität München, **1998**.
- [98] J. Seifert, *Dissertation*, Technische Universität München, **1997**.
- [99] Z. H. Qin, H. Li, M. S. Cai, Z. J. Li, *Carb. Res.* **2002**, *337*, 31-36.
- [100] J. Seifert, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6527-6530.
- [101] a) P. J. Garegg; H. Hultberg, *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, C10-C11.
b) P. J. Garegg; H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.* **1982**, *108*, 97-101.
c) P. J. Garegg, *Pure Appl. Chem.* **1984**, 845-858.
- [102] M. P. DeNinno; J. B. Etienne, K. C. Duplantier, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 669-672.
- [103] M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5547-5551.
- [104] S. D. Debenham, E. J. Toone, *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 385-387.
- [105] J. J. Gridley, H. M. I. Osborn, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2000**, 1471-1491.
- [106] W. Günther, H. Kunz, *Carbohydrate Res.* **1992**, *228*, 217-241.
- [107] A. Fürstner, I. Konetzki, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5721-5724.
- [108] J. Kerekgyarto, J. G. M. van der Ven, J. P. Kamerling, A. Liptak, J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.* **1993**, *238*, 135-145.
- [109] F. Barresi, O. Hindsgaul zitiert in: J. J. Gridley, H. M. I. Osborn, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2000**, 1471-1491.
- [110] a) F. Barresi, O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9376-9377.
b) F. Barresi, O. Hindsgaul, *Synlett* **1992**, 759-761.
c) F. Barresi, O. Hindsgaul, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*(6), 1447-1465.
- [111] G. Stork, J. La Clair, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 247-248.
- [112] a) Y. Ito; T. Ogawa, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1994**, *33*, 1765-1767.
b) Y. Ohnishi, H. Ando, T. Kawai, Y. Nakahara, Y. Ito, *Carbohydrate Res.* **2000**, *328*, 263-276.

- c) Y. Ito, H. Ando, M. Wada, T. Kawai, Y. Ohnishi, Y. Nakahara, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4123-4132.
- [113] a) C. M. P. Seward, I. Cumpstey, M. Aloui, S. C. Ennis, A. J. Redgrave, A. J. Fairbanks, *Chem. Commun.* **2000**, 1409-1410.
 b) S. C. Ennis, A. J. Fairbanks, C. A. Slinn, R. J. Tennant-Eyles, H. S. Yeates, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4221-4230.
 c) I. Cumpstey, A. J. Fairbanks, A. J. Redgrave, *Org. Lett.* **2001**, *15*(3), 2371-2374.
- [114] O. Nashiru, S. G. Withers et al., *Angew. Chem.* **2001**, *113*(2), 431-434.
- [115] M. Scigelova, S. Singh, D. H. G. Crout, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 777-782.
- [116] a) D. Crich, S. Sun, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4506-4507.
 b) D. Crich, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11217-11223.
 c) D. Crich, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 435-436.
 d) D. Crich, S. Sun, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8321-8348.
 e) D. Crich, W. Cai, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4926-4930.
 f) D. Crich, W. Cai, Z. Dai, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1291-1297.
- [117] R. Weingart, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8753-8758.
- [118] D. Ruckdeschel, mündliche Mitteilungen.
- [119] V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1702-1706.
- [120] a) S. Thea, G. Cevasco, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*(43), 5193-5194.
 b) S. Thea, G. Cevasco, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*(23), 2865-2866.
- [121] M. Yun, Y. Shin, K. H. Chun, J. E. N. Shin, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2000**, *21*(6), 562-566.
- [122] Berechnungen wurden durchgeführt mit dem Programm CS Chem3D Pro 5.0 (1999), CambridgeSoft Corporation.
- [123] Berechnungen wurden durchgeführt mit dem Programm PC Spartan Pro 1.0.5 (16. Aug. 2000), Wavefunction, Inc.
- [124] Dargestellt ist die durch semi-empirische PM3-Berechnungen^[123] erhaltene Molekülgeometrie als 0.002 Elektronen/Bohr³-Oberflächenfunktion.
- [125] C. Unverzagt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1102-1104.
- [126] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1170-1173.
- [127] Substanz wurde freundlicherweise von H. Weiß zur Verfügung gestellt.
- [128] S. Guo, T. Sato, K. Shirane, K. Furukawa, *Glycobiology* **2001**, *11*(10), 813-820.

- [129] O. Schwardt, G. Baisch, R. Öhrlein, *Bioorg. & Med. Chem.* **2001**, 9(7), 1857-1869.
- [130] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9308-9309.
- [131] A. Redlitz, *Diplomarbeit*, Berlin, **1988**.
- [132] S. Narasimhan, J. C. Freed, H. Schachter, *Biochemistry* **1985**, 24, 1694-1700.
- [133] N. Kurosawa, M. Kawasaki, T. Hamamoto, T. Nakaoka, Y. C. Lee, M. Arita, S. Tsuji, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 219(1-2), 375-381.
- [134] <http://www.dkfz-heidelberg.de/spec/sweet2/doc/> bzw. <http://www.dkfz-heidelberg.de/spec/> (Stand: 27.02.2002)
- [135] http://www.dkfz-heidelberg.de/spec/sweet2/doc/input/sba_example.html
(Stand: 27.02.2002) Da Webpages nicht immer online sind, sind nachfolgend die Literaturstellen der oben genannten Webpage aufgeführt:
- [0] A. J. Petrescu, S. M. Petrescu, R. A. Dwek and M. R. Wormland, (1999), A statistical analysis of *N*- and *O*-glycan linkage conformations from crystallographic data, *Glycobiology*, vol. 9, no. 4, 343-352
- [1] Rasmussen, K. and Fabricius, J (1990) in: *Computer Modeling of Carbohydrate Molecules*. French, A.D. and Brady, J. (Eds.) ACS Symposium Series 439, pp 177-190, American Chemical Society, Washington, DC
- [2] Imberty A., Gerber S., Tran V., Perez S. (1990) Data Bank of Three-Dimensional Structure of Disaccharides, A Tool to Build 3D Structure of Oligosaccharide Glycoconjugate J , 7; 27-54
- [3] Woods R.J., Pathiaseril A., Wormald M.R., Edge C.J., Dwek R.A. (1998) The high degree of internal flexibility observed for an oligomannose oligosaccharide does not alter the overall topology of the molecule *Eur. J. Biochem.*, 258, 372-386
- [4] Homans, S.W, Dwek R.A., Rademacher T.W. (1987) Tertiary Structure in *N*-Linked Oligosaccharides, *Biochem.*, 26, 6553-6560
- [5] Homans, S.W., Pastore, R.A., Dwek R.A., Rademacher T.W. (1987) Structure and Dynamics in Oligomannose-Type-Oligosaccharides, *Biochem.* 26, 6649-6655
- [6] Rutherford T.J., Homans S.W. (1994) Restrained vs Free Dynamics Simulation of Oligosaccharides: Application to Solution Dynamics of Biantennary and Bisected Biantennary *N*-Linked Glycans *Biochem.* 33, 9609-9614

- [7] Kozar T., Tvaroska I., Carver J.P., Studies on the conformational behaviour of GlcNac-Man3-GlcNac2 oligosacchrides using molecular dynamics simulations, *Glycoconjugate J.* (1988), 15, 187-191
- [8] Qasba P.K., Balaji P.V., Rao V.S., Molecular dynamics simulation of oligosaccharides and their conformation in the crystal structure of lectin-carbohydrate complex: importance of the torsion angle psi for the orientation of a 1,6-arm, *Glycobiology* (1994), vol. 4, no. 6, 805-815
- [136] <http://dasher.wustl.edu/tinker/> (Stand: 27.02.2002)
- [137] H. J. Gabius, S. Gabius, *Glycosciences*, Chapman & Hall, Weinheim, **1997**
- [138] C. Unverzagt, S. André, J. Seifert, S. Kojima, C. Fink, G. Srikrishna, H. Freeze, K. Kayser, H. J. Gabius, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 478-491.
- [139] M. Monsigny, C. Petit, A.-C. Roche, *Analyt. Biochem.* **1988**, 175, 525-530.
- [140] V. Adasch, B. Hoffmann, W. Milius, G. Platz, G. Voss, *Carbohydr. Res.* **1998**, 314, 177-187.
- [141] O. Lockhoff, P. Stadler, *Carbohydr. Res.* **1998**, 314, 13-24.
- [142] Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerhard Kretzschmar, Frankfurt.
- [143] F. Poccia, C. Agrati, G. Ippolito, V. Colizzi, M. Malkovsky, *Current Mol. Med.* **2001**, 1(1), 137-151.
- [144] S. Porcelli, R. Modlin, *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, 17, 297-329.
- [145] M. Salomon, *Diplomarbeit*, Universität Genf, **2000**
- [146] B. Jakob, G. Voss, H. Gerlach, *Tetr. Asymm.* **1996**, 7(11), 3255-3562.
- [147] C. R. Hauser, D. S. Breslow, *Org. Synth.* **1941**, 21, 51ff.
- [148] H. Henke, „Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20“, **1994**, Obernburg.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht diese oder eine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden habe.

Bayreuth, den 09. April 2002

Ingo Prahl